



---

seit 1558

# **Der Einfluß von *ephrinA5* auf die Morphologie von Sternzellen im somatosensorischen Cortex der Maus**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. Biol. André Güllmar

geboren am 18.05.1976 in Leinefelde



1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Bolz

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie  
Erbertstraße 1  
07743 Jena

2. Gutachter: Prof. Dr. Siegrid Löwel

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie  
Erbertstraße 1  
07743 Jena

3. Gutachter: Prof. Dr. Mark Hübener

Max-Planck-Institut für Neurobiologie  
Abteilung Zelluläre und Systemneurobiologie  
Am Klopferspitz 18  
82512 Martinsried

Tag der Prüfung: 28.08.2007

Tag der Verteidigung: 19.11.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Aufbau des Cortex.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Entwicklung des Cortex.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Radiale und tangentielle Migration .....	4
1.2.2. Ausbildung thalamocorticaler und corticothalamischer Projektionen .....	5
1.2.3. Entwicklung der Dendriten und Spines.....	9
<b>1.3. Das <i>ephrin/Eph</i>-System .....</b>	<b>13</b>
1.3.1. Aufbau der <i>ephrine</i> und <i>Eph</i> -Rezeptoren.....	14
1.3.2. <i>ephrin/Eph</i> -Interaktionen und Signaltransduktion .....	14
1.3.3. Die Bedeutung des <i>ephrin/Eph</i> -Systems während der Entwicklung.....	17
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>20</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Materialien .....</b>	<b>21</b>
3.1.1. Versuchstiere .....	21
3.1.2. Oligonukleotid-Primer .....	21
3.1.3. Enzyme.....	21
3.1.4. Chemikalien .....	22
3.1.5. Gase .....	23
3.1.6. Geräte .....	23
<b>3.2. Puffer und Stammlösungen .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.3.1. Genotypisierung .....	25
Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.3.2. Beschichtung von Wolframkugeln mit lipophilen Farbstoffen.....	27
3.3.3. Gewebepräparation.....	28
3.3.4. Ballistische Markierung von Zellen .....	29
3.3.5. Laser-Scanning-Mikroskopie .....	30
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Genotypisierung .....</b>	<b>32</b>



<b>4.2. Eindringtiefe der Wolframpartikel in perfundiertes Gewebe .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Markierung mit mehreren Farbstoffen.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Adendritische Zellen .....</b>	<b>36</b>
<b>4.5. Markierung von lebendem Gewebe.....</b>	<b>38</b>
4.5.1. <i>Time-lapse</i> -Mikroskopie von embryonalen Zellen .....	38
4.5.2. Markierung von postnatalen Zellen.....	41
<b>4.6. Vergleich der Schicht-4-Sternzellen von <i>ephrinA5</i>-Knockout- und Wildtyp-Mäusen .....</b>	<b>43</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1. Die ballistische Markierung von Neuronen .....</b>	<b>53</b>
5.1.1. Markierung von lebendem und perfundiertem Gewebe.....	54
<b>5.2. Adendritische Zellen .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3. Die Auswirkungen des Fehlens von <i>ephrinA5</i> auf die Entwicklung der Sternzellen in Schicht 4.....</b>	<b>56</b>
5.3.1. Molekulare Mechanismen der Dendriten- und Spine-Entwicklung.....	56
5.3.2. Aktivitätsabhängige Regulation der Dendriten- und Spine-Entwicklung.....	59
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>I</b>
<b>8.1. Abkürzungen .....</b>	<b>I</b>
<b>8.2. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>II</b>
<b>8.3. Danksagung.....</b>	<b>III</b>
<b>8.4. Lebenslauf .....</b>	<b>V</b>
<b>8.5. Eigene Publikationen .....</b>	<b>VI</b>

*Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.*

Enrico Fermi

## 1. Einleitung

Die Entwicklung vielzelliger Organismen ist ein höchstkomplexer Prozeß, der verschiedene Mechanismen, wie Zellteilung, -differenzierung und -migration als auch die kontrollierte Eliminierung von Zellen bzw. Zellfortsätzen beinhaltet. Vor allem bei der Entwicklung des Nervensystems besteht das Problem, daß eine sehr große Anzahl von einzelnen, nicht miteinander verbundenen Neuronen ein spezifisches Netzwerk ausbilden müssen, welches in der Lage ist, sensorische Informationen zu verarbeiten und eine adäquate Reaktion zu generieren. Um diese neuronalen Verschaltungen zu bilden, müssen die ausgewachsenen Axone Synapsen mit ihren Zielzellen, hauptsächlich deren Dendriten, formen. Im Falle des menschlichen Gehirns handelt es sich dabei um etwa  $10^{12}$  Neurone, die untereinander jeweils mit mehreren tausend bzw. zehntausend Neuronen verknüpft sind. Für die korrekte Entwicklung dieser enormen Anzahl von Verbindungen ist ein hochentwickeltes regulatorisches System Voraussetzung, welches mit dem, im Vergleich dazu, gering ausfallenden genetischen Informationsgehalt der Zellen auskommen muß. Dazu besitzt dieses System eine Vielzahl von Mechanismen. Zum Beispiel werden räumlich und zeitlich begrenzt, Transkriptionsfaktoren gebildet, die wiederum die Transkription anderer Gene an- oder abschalten können. Weiterhin kann das Primärtranskript eines Gens alternativ gespleißt werden, so daß ein Gen für mehrere Proteine codiert. Auf der RNA-Ebene spielen außerdem noch die micro-RNAs, kleine nichtcodierende RNAs, eine große Rolle. Sie beeinflussen eine Vielzahl von Prozessen, wie die Transkription und Translation, aber auch die mRNA- und Protein-Stabilität. Nicht zuletzt gibt es noch eine Reihe epigenetischer Mechanismen, wie die Methylierung der DNA und chemische Modifikationen der Histone, welche Gene stumm schalten können. All das sorgt dafür, daß Proteine, die wichtig für den Aufbau und die Funktion des Nervensystems sind, zu einer bestimmten Zeit in der richtigen Menge gebildet bzw. aktiviert werden.

Ihrem intrinsischen Programm folgend, bilden die Neurone axonale und dendritische Fortsätze aus, die dann auf ein komplexes Umfeld, bestehend aus anderen Neuronen und Gliazellen, treffen. Die Wachstumskegel dieser Fortsätze besitzen eine Vielzahl membranständiger Rezeptoren, mit denen sie ihre lokale Umgebung wahrnehmen können. Vor allem die Axone, die unter Umständen lange Strecken zu ihren Zielzellen zurücklegen müssen, werden von sogenannten Lenkungsmolekülen zu ihrem Ziel geführt. Neben diesen aktivitätsunabhängigen Prozessen, ist die Aktivität der Neurone, also der sensorische Input, genauso wichtig für die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes.

## **1.1. Aufbau des Cortex**

Aufgrund der Furchung des Cortex kann dieser in vier verschiedene Lappen unterteilt werden, die nach den Schädelknochen, unter denen sie sich befinden, benannt sind: der Frontallappen, der Parietallappen, der Temporallappen und der Okzipitallappen. Vom Neocortex wird der limbische Cortex unterschieden. Der ist kein separates Gebiet, sondern besteht aus den medialen Anteilen des Frontal-, Parietal- und Temporallappens, die dem Hirnstamm und dem Diencephalon aufliegen. Außerdem kann der Cortex nach Funktionen unterteilt werden. Es gibt Regionen, die hauptsächlich für die Verarbeitung sensorischer Information verantwortlich sind und Regionen, die mit der Aussendung und Übertragung motorischer Befehle assoziiert sind. Diese Regionen wiederum sind innerhalb einer spezifischen Modalität hierarchisch in Areale unterteilt, die bestimmte Aufgaben in der Informationsverarbeitung haben. Sie werden als primäre, sekundäre oder tertiäre sensorische bzw. motorische Areale bezeichnet. Es gibt z.B. den primären motorischen, somatosensorischen, visuellen und auditorischen Cortex. Jedes primäre sensorische Areal sendet Information an ein benachbartes Areal höherer Ordnung (sekundäres sensorisches Areal), von dem aus die Information zu einem tertiären oder multimodalen Assoziationsareal geleitet wird, wo die Koordination von mehreren sensorischen Modalitäten erfolgt. Im Gegenzug dazu senden höhere motorische Zentren komplexe Informationen, die für eine motorische Handlung benötigt werden, an den primären motorischen Cortex (Felleman und Van Essen, 1991; Kandel und Squire, 2000).

Anatomisch läßt sich der Neocortex horizontal in 6 Schichten unterteilen, die sich von der Pia mater bis zur Weißen Substanz erstrecken. Die Neurone in den verschiedenen Schichten unterscheiden sich in Größe, Form und Packungsdichte. Sie können in Pyramidenzellen und Nicht-Pyramidenzellen unterteilt werden. Die Pyramidenzellen sind excitatorische Projektionsneurone, die typischerweise einen pyramidenförmigen Zellkörper besitzen, von dem ein dominanter apikaler Dendrit vertikal in Richtung Pia sowie mehrere basale Dendriten entspringen. Alle Dendriten der Pyramidenzellen weisen Spines auf, allerdings mehr im distalen als im proximalen Bereich, da sich nahe am Zellkörper hauptsächlich die inhibitorischen Schafstsynapsen befinden. Zu den Nicht-Pyramidenzellen werden alle Neurone gezählt, die nicht die typische Form der Pyramidenzellen besitzen. Dazu gehören auch die Sternzellen, die einen mehr oder weniger kugelförmigen Zellkörper besitzen, von dem sich die Dendriten radiärsymmetrisch ausbreiten. Sie lassen sich in die glatten inhibitorischen Sternzellen und die dorntragenden excitatorischen Sternzellen unterteilen. Wie der Name

schon sagt, besitzen nur die Dendriten der dorntragenden Sternzellen Spines. Beide Sternzelltypen sind Interneurone, deren Axone nur innerhalb eines corticalen Areals in andere Schichten projizieren. Während die Pyramidenzellen vor allem in den Schichten 2/3 sowie 5 und 6 vorkommen, befinden sich die meisten dorntragenden Sternzellen in der Schicht 4, der Eingangsschicht der thalamischen Afferenzen. Der sensorische Input gelangt also hauptsächlich über Schicht 4 in den Cortex. Die Schicht 4 Neurone projizieren wiederum in Schicht 2/3, von wo aus die Information in Schicht 5 und in die Schicht 2/3 anderer corticaler Areale gelangt. Die Neurone in Schicht 5 senden Axoncollaterale in Schicht 6 und die Zellen beider Schichten projizieren in subcorticale Areale.

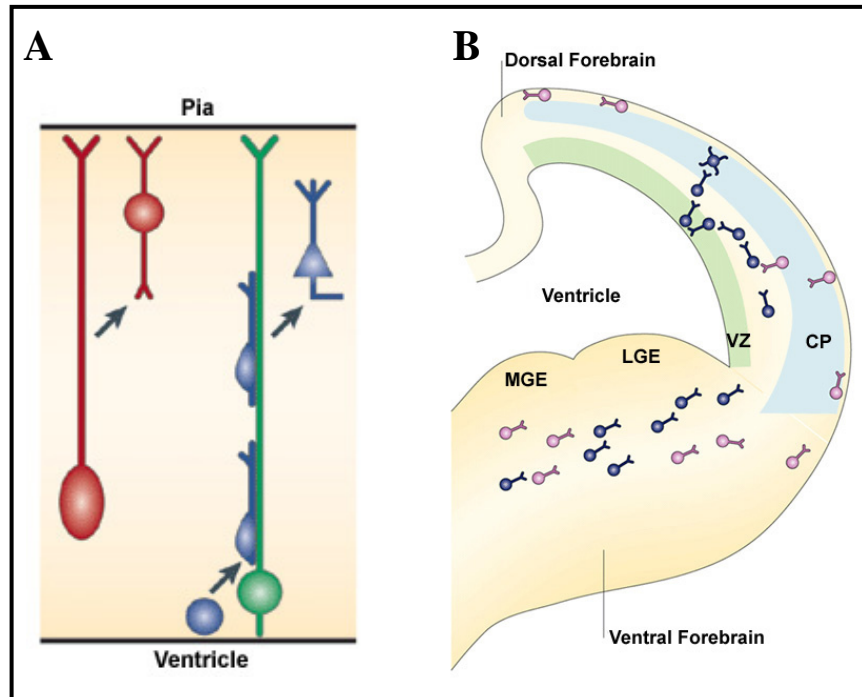
Zusätzlich zu der laminaren Organisation weisen viele corticale Areale eine vertikale Organisation in Kolumnen auf. Innerhalb einer Kolumne antworten die Neurone auf den gleichen spezifischen Reizparameter. Die Kolumnen können zu Hyperkolumnen zusammengefaßt werden, in denen alle spezifischen Parameter eines Reizes verarbeitet werden. Letztendlich wird die Kombination aus allen Hyperkolumnen als Modul bezeichnet. Dieser modulare Aufbau ist ein generelles Organisationsprinzip im Cortex. Welcher Mechanismus ist dafür verantwortlich, daß sich die Neurone zu solchen distinkten radialen Kolumnen verbinden? Eine Hypothese ist die, daß die Neurone, die auf gleiche Reizparameter reagieren sollen, während der frühen corticalen Entwicklung über *gap-junctions* elektrisch gekoppelt sind (Peinado et al., 1993b).

## **1.2. Entwicklung des Cortex**

### **1.2.1. Radiale und tangentielle Migration**

Ein charakteristisches Merkmal zahlreicher Neurone der Vertebraten ist, daß sie von dem Ort, wo sie entstehen, wegwandern. Für corticale Neurone gibt es 2 Migrationswege, die radiale Migration, die die meisten corticalen Neurone ausführen und die tangentielle Migration der GABAergen Interneurone. Radial auswandernde Neurone entstehen in der Ventrikularzone des dorsalen Telencephalons. Während der frühen Phase der Cortexentwicklung bilden die Neurone einen Fortsatz in Richtung Pia aus und ziehen anschließend den Zellkörper nach. Während späterer Stadien, wenn der Cortex an Dicke zugenommen hat, wandern die Neurone entlang radialer Gliazellen, bis sie ihre Zielposition in der corticalen Platte erreicht haben (Abb. 1.1A). Die corticalen Schichten werden dabei nach dem *inside-out*-Prinzip gebildet. Die unteren Schichten entstehen zuerst und die superfiziellen Schichten werden später gebildet (Luskin und Shatz, 1985; Molnar et al., 2006; Rakic, 1974). Der „Geburtsort“ eines Neurons entscheidet also über seinen Bestimmungsort und seine Eigenschaften.

Die GABAergen Interneurone entstehen nicht in der Ventrikularzone, sondern in den Anlagen der Basalganglien, den ganglionischen Eminenzen des ventralen Telencephalons. Die Area Entopedunculare (AEP), die mediale ganglionische Eminenz (MGE) und die laterale ganglionische Eminenz (LGE) sind die Strukturen, in denen die meisten GABAergen corticalen Interneurone entstehen, die dann tangential in den Cortex, den Hippocampus aber auch in den olfaktorischen Bulbus und ins Striatum migrieren. Wenn die Zellen ihre Zielregion erreicht haben, findet eine ventrikelorientierte Migration statt und nach einer „Orientierungspause“ wandern die Zellen radial in die corticale Platte ein (Abb. 1.1B) (Anderson et al., 1997; Anderson et al., 2001; DeDiego et al., 1994; Lavdas et al., 1999; Marin und Rubenstein, 2001; Mione et al., 1997; Nadarajah et al., 2002; Olivier et al., 2001; Sussel et al., 1999; Tan et al., 1998; Van Eden et al., 1989; Wichterle et al., 1999).



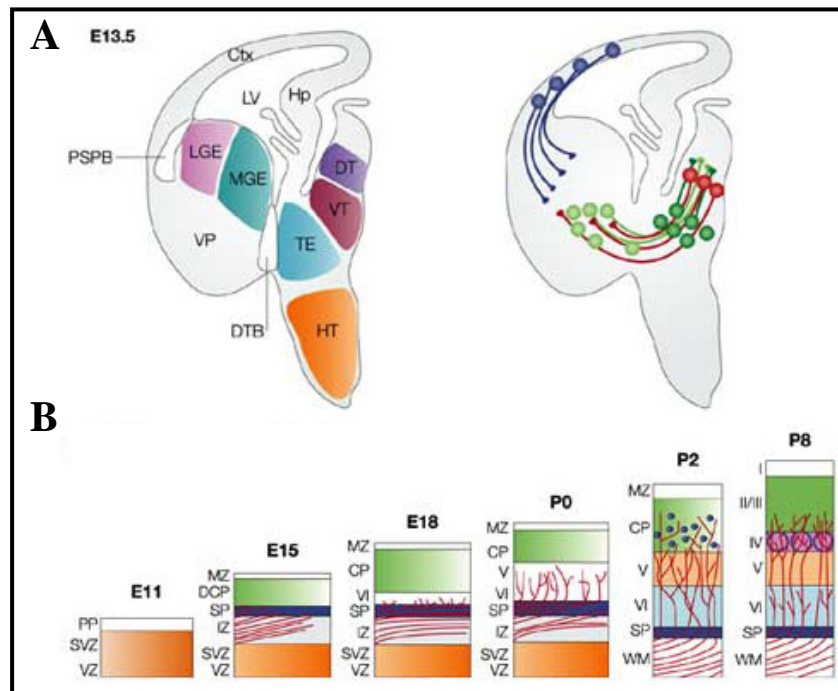
**Abb. 1.1:** Radiale und tangential Migration. **(A)** Modell der radialen Migrationsformen. Die somatische Translokation (rot) kommt vor allem während der frühen Cortextentwicklung vor, während die Migration entlang der Glia (blau) in späteren Stadien stattfindet. **(B)** Tangentiale Migrationswege corticaler Interneurone. Von der lateralen und medialen ganglionischen Eminenz migrieren die Interneurone durch die Intermediärzone (blaue Zellen) und Marginalzone (rosa Zellen). CP = corticale Platte, LGE = laterale ganglionische Eminenz, MGE = mediale ganglionische Eminenz, VZ = Ventrikularzone. Verändert nach Nadarajah und Parnavelas (2002).

### 1.2.2. Ausbildung thalamocorticaler und corticothalamischer Projektionen

Die thalamischen Zellen des Ventrobasalen Nucleus, welche in das somatosensorische Areal (S1) des Cortex projizieren, entstehen bei der Maus zwischen E10 und E13 (Angevine, 1970). Ungefähr zur gleichen Zeit, ab E11, beginnt auch die Cortextentwicklung (Caviness, 1982; Polleux et al., 1997). Noch während der Zelldifferenzierung, zwischen E12 und E18, beginnen beide Gebiete sich durch Ausbildung reziproker Projektionen zu verbinden (Lopez-Bendito und Molnar, 2003). Dabei müssen die Axone verschiedene Grenzlinien überqueren, um ihre Zielzellen zu erreichen, wie die zwischen Di- und Telencephalon, sowie Pallium und Subpallium (Abb. 1.2A). Diese Zonen weisen verschiedene molekulare Eigenschaften auf. Zum Beispiel ist die Grenze zwischen Pallium und Subpallium durch das Vorhandensein von *Pax6* (Stoykova und Gruss, 1994), sowie die fehlende Expression von *Emx1* und *Dlx1* (Puelles et al., 2000) charakterisiert und wirkt sowohl als Korridor für Axone, wie auch für migrierende Zellen (Molnar und Butler, 2002). Die thalamocorticalen Axone wachsen

zunächst ventral in Richtung der Grenze des Thalamus, drehen anschließend nach lateral und überschreiten die Grenze zwischen Di- und Telencephalon, dringen in die interne Kapsel ein und treffen dort auf die corticothalamischen Axone. Die erste Zellpopulation, die corticothalamische Axone aussendet, sind die Neurone der *subplate*. Die folgenden Axone stammen von Zellen aus der sich entwickelnden corticalen Platte (Auladell et al., 2000; De Carlos und O'Leary, 1992; McConnell et al., 1989).

Die corticalen axonalen Fortsätze wachsen ventral bis in die Intermediärzone, drehen nach lateral und verlaufen in der Intermediärzone parallel zur Pia. Nach dem Überschreiten der Grenze zwischen Pallium und Subpallium wachsen sie in Richtung der lateralen ganglionischen Eminenz und erreichen am Embryonaltag 14 die interne Kapsel. In der *handshake hypothesis* wurde postuliert, daß die Projektionen vom Thalamus und von Zellen der corticalen *subplate* im basalen Telencephalon miteinander interagieren, so daß die thalamischen Axone entlang des Gerüsts der corticalen Axone in den Cortex einwachsen können (Molnar et al., 1998a). Es stellt sich aber die Frage, ob beide Gruppen von Axonen wirklich von der jeweils anderen Gruppe abhängig sind, um in Richtung ihres Zielgebietes zu wachsen, oder ob sie autonom ihr Zielgebiet erreichen. Die *in-vitro*-Daten von (Bagnard et al.,



**Abb. 1.2:** Die Entwicklung thalamocorticaler und corticothalamischer Projektionen. (A) Am Embryonaltag 13,5 verlassen thalamische Axone (rot) den dorsalen Thalamus (DT) und überqueren die Grenze zwischen Diencephalon und Telencephalon (DTB). Zur selben Zeit verlassen die corticothalamischen Axone (blau) den Cortex (Ctx) und überqueren nach einer kurzen Pause die Grenze zwischen Pallium und Subpallium (PSPB). (B) Das Einwachsen thalamischer Axone in den sich entwickelnden Cortex. Die thalamischen Axone erreichen den Cortex am Embryonaltag 15 und akkumulieren in der *subplate* (SP). In der frühen postnatalen Phase dringen sie in die Schichten 5 und 6 sowie in die corticale Platte ein und bilden am Ende der 1. postnatalen Woche (P8) die typische Barrel-Anordnung in Schicht 4 aus.

Hp = Hippocampus, HT = Hypothalamus, IZ = Intermediärzone, LGE = laterale ganglionische Eminenz, LV = lateraler Ventrikel, MGE = mediale ganglionische Eminenz, MZ = Marginalzone, PP = *preplate*, SVZ = Subventrikulärzone, TE = thalamische Eminenz, VP = ventrales Pallium, VT = ventraler Thalamus, VZ = Ventrikulärzone, WM = Weiße Substanz. Nach Lopez-Bendito und Molnar (2003).

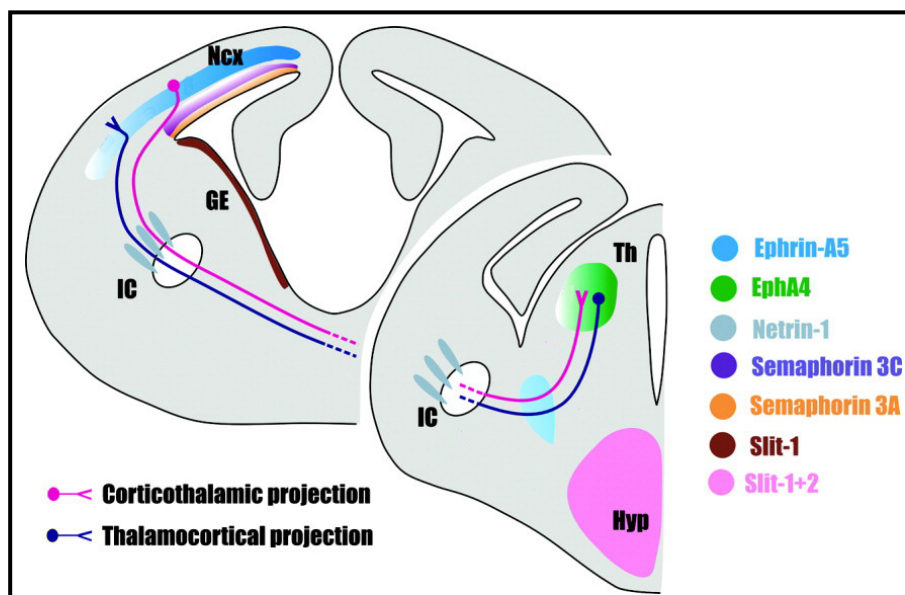


2001) zeigen, daß zwar thalamische Wachstumskegel oft an anderen thalamischen Axonen entlang wachsen, ebenso wie corticale Wachstumskegel mit anderen corticalen Axonen Fascicel bilden, aber wenn thalamische Fasern auf corticale treffen, kollabieren in den meisten Fällen die Wachstumskegel und die Axone werden zurück gezogen. Außerdem konnten Torii und Levitt (2005) *in vivo* zeigen, daß bei einer Überexpression von *EphA7* zwar die Topographie der corticothalamischen Projektionen verändert war, aber nicht die der thalamocorticalen Projektionen, was ebenfalls dafür spricht, daß die thalamischen und corticalen Axone räumlich getrennt verlaufen und nicht interagieren.

Am Embryonaltag 15 erreichen die ersten thalamischen Axone die *subplate* (Abb. 1.2B) (Auladell et al., 2000). Die Sternzellen der Schicht 4, das Hauptziel dieser Afferenzen, werden zwischen E 13 und E 16 geboren (Caviness, 1982; Polleux et al., 1997). Die Axone akkumulieren und warten in der *subplate*, bis die meisten ihrer Zielzellen aus der Ventrikularzone zu ihrer Zielposition in der corticalen Platte migriert sind (Ghosh und Shatz, 1992; Rakic, 1977). Die exakte Länge dieser Warteperiode bei *Rodentia* ist umstritten (Catalano et al., 1991; Catalano et al., 1996; Deng und Elberger, 2003; Molnar et al., 1998a; Molnar et al., 1998b), aber viel kürzer als bei größeren Säugetieren. Zwischen den postnatalen Tagen 2 und 5 verzweigen schließlich die thalamischen Axone in den Schichten 4 und 6 (Rebsam et al., 2002).

Wie finden aber die wachsenden Axone, die diese langen Projektionen im Nervensystem bilden, ihr Ziel? Sie besitzen an ihrer Spitze eine spezialisierte Struktur, den Wachstumskegel. Dieser läßt sich in drei Regionen einteilen: Filopodien, Lamellopodien und eine zentrale Einheit (Kandel und Squire, 2000). Membranständige Rezeptoren, die sich am Wachstumskegel befinden, erkennen Signale, die als Axonlenkungsmoleküle fungieren und attraktiv oder repulsiv auf das Auswachsen des Axons wirken. Die Lenkungsmoleküle können zur extrazellulären Matrix gehören, membrangebunden sein oder sezerniert werden (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). Auf dem Weg zu seinem endgültigen Zielgebiet passiert ein Axon mehrere intermediäre Ziele, an denen sich die Wirkung der Lenkungsmoleküle ändern kann. In Abhängigkeit vom Rezeptorrepertoire und den aktivierten Wegen der Signaltransduktion können viele Axonlenkungsmoleküle sowohl attraktiv als auch repulsiv wirken. Ein grundlegender Mechanismus, über den Lenkungsmoleküle das Wachstum des Axons beeinflussen können, ist die Regulation der Aktinpolymerisation bzw. -depolymerisation in den Filopodien (O'Connor et al., 1990). Einige dieser membrangebundenen oder diffusiblen Faktoren, welche von den verschiedenen intermediären und finalen Zielgebieten exprimiert werden, sind z.B. *ephrinA5*, *EphA4*, *Netrin1*, *Semaphorin*

3A und 3C, sowie *Slit1* und 2 (Abb. 1.3). So werden *Slit1* und 2 im Hypothalamus exprimiert (Bagri et al., 2002) und wirken repulsiv auf thalamische Axone, damit diese aus dem Diencephalon ins ventrale Telencephalon einwachsen. Der *ephrinA5*-Gradient im ventralen Telencephalon ist für das Vorsortieren der thalamischen Axone mitverantwortlich (Dufour et al., 2003). In der internen Kapsel wirkt *Netrin1* als attraktives Molekül auf beide Axonpopulationen (Braisted et al., 2000). Auf corticale Axone wirkt *Semaphorin 3C* attraktiv, damit diese nach ventral auswachsen und *Semaphorin 3A* repulsiv, damit sie anschließend in der Intermediärzone ihre Richtung ändern und aus dem Cortex auswachsen (Bagnard et al., 1998). Schließlich tragen die komplementären *EphA4*- und *ephrinA5*-Gradienten, im Thalamus und Cortex, zur Ausbildung der korrekten topographischen Verbindungen bei (Gao et al., 1998; Mackarechtschian et al., 1999; Vanderhaeghen et al., 2000).

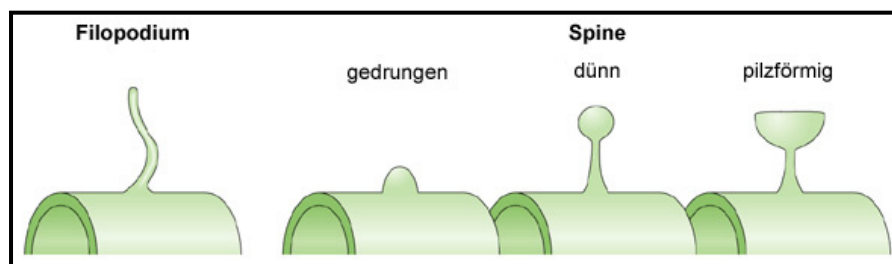


**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der Expression einiger Lenkungsmoleküle für thalamocorticale und corticothalamische Axone. Erläuterung im Text.  
GE = ganglionische Eminenz, Hyp = Hypothalamus, IC = interne Kapsel, Ncx = Neocortex, Th = Thalamus. Nach Uziel et al. (2006).

### 1.2.3. Entwicklung der Dendriten und Spines

Während der neuronalen Entwicklung wachsen die Dendriten von einem morphologisch unpolarierten Neuron in eine definierte Richtung aus, vergrößern ihren Durchmesser und verzweigen sich in bestimmten Abständen, bis sie an definierten Grenzen ihr Wachstum stoppen und damit ihre zellspezifische Form ausgebildet haben. Für das Wachstum und die Wegfindung besitzen die Dendriten, ähnlich wie die Axone, an ihrer Spitze einen Wachstumskegel.

Parallel zu dem Wachstumsprozeß bilden die Dendriten an ihrem Schaft zunächst lange, dünne und hoch motile Strukturen, die Filopodien aus, die später durch die kürzeren Spines ersetzt werden. Dendritische Spines repräsentieren die postsynaptische Komponente der meisten excitatorischen Synapsen. Der typische Spine besteht aus einem rundlichen Kopf, der über einen schmalen Hals mit dem dendritischen Schaft verbunden ist (Sorra und Harris, 2000). Allerdings kommen die Spines in einer Vielzahl verschiedener Formen und Größen vor (Abb. 1.4).



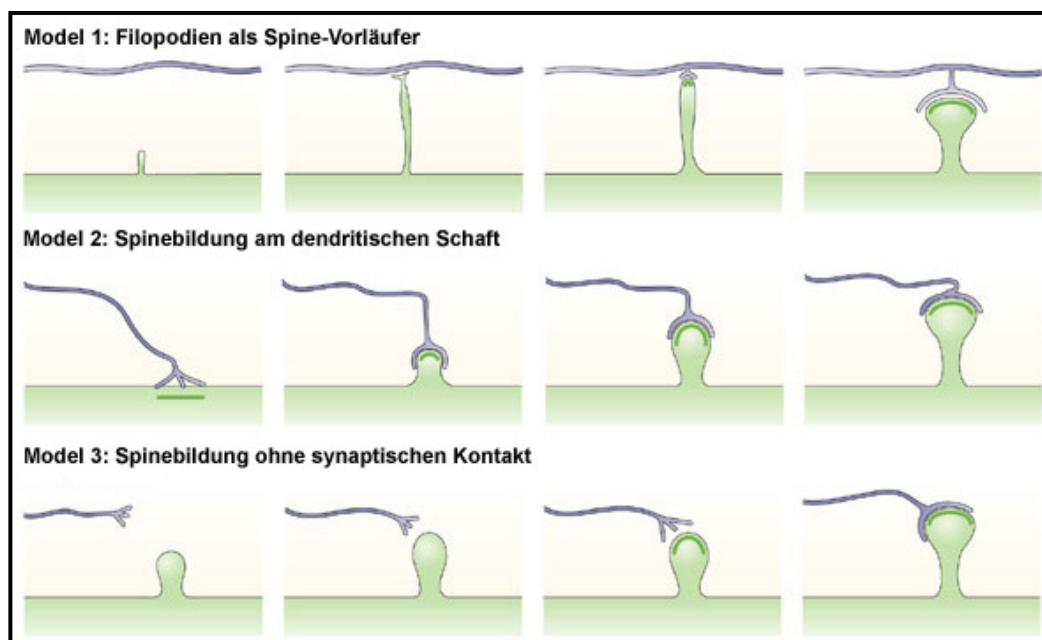
**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung eines Filopodiums und der 3 häufigsten Spine-Arten. Verändert nach Yuste und Bonhoeffer (2004).

Der Spine-Kopf enthält das *postsynaptic density*, eine elektronendichte Struktur gegenüber der präsynaptischen Region, aus der die Neurotransmitter freigesetzt werden (Li und Sheng, 2003; Scannevin und Huganir, 2000). Es besteht aus dichtgepackten Ionenkanälen und Oberflächenrezeptoren, die mit Signalproteinen und Proteinen des Zytoskeletts einen Komplex bilden. Aktinfilamente sind die Hauptkomponente des Zytoskeletts in Spines, während Mikrotubuli nur im dendritischen Schaft vorkommen und normalerweise nicht in die Spines abzweigen (Bernhardt und Matus, 1984; Kaech et al., 1997). Weiterhin enthalten manche Spines Elemente des glatten Endoplasmatischen Retikulums, welches in größeren Spines den Spine-Apparat bildet. Möglicherweise könnte der Spine-Apparat als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und als Reservoir für Rezeptoren und Ionenkanäle, die im *postsynaptic density* benötigt werden, dienen (Tarrant und Routtenberg, 1979). Polyribosomen und Elemente des endosomal-lysosomalen Abbauwegs kommen ebenfalls in manchen Spines vor, was zeigt, daß

lokale Proteinsynthese von dendritischer mRNA, wie auch Proteinabbau in den Spines stattfinden kann (Steward und Schuman, 2001). Da die Spines aus der Oberfläche des Dendriten hervorstehen, ist es möglich weiter entfernte Axonendigungen, wie auch höhere synaptische Dichten zu erreichen (Sorra und Harris, 2000). Durch die Geometrie der Spines können diese als elektrische Kompartimente fungieren (Nimchinsky et al., 2002; Segev und Rall, 1998; Svoboda et al., 1996). So spielt die Länge des Spines-Halses eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von Membranpotentialen und kann Synapsen elektrisch isolieren (Araya et al., 2006).

### Modelle der Spineentwicklung

Es gibt verschiedene Ansichten über die Entstehung der dendritischen Spines. Ein Modell beschreibt die Entwicklung der Spines aus den dendritischen Filopodien, nachdem diese synaptischen Kontakt mit einem Axon gebildet haben (Marrs et al., 2001; Vaughn, 1989; Ziv und Smith, 1996). Nach einem anderen Modell wird davon ausgegangen, daß die Spines an Synapsen entstehen, die ursprünglich am dendritischen Schaft gebildet wurden (Miller und Peters, 1981). Ein drittes Modell wiederum beschreibt die Bildung von Spines ohne vorangegangenen synaptischen Kontakt (Sotelo, 1990) (Abb. 1.5).



**Abb. 1.5:** Die drei Modelle der Spine Entwicklung. Verändert nach Yuste und Bonhoeffer (2004).

### *Filopodien als Spine-Vorläufer*

In den frühen Stadien der Synaptogenese befinden sich an den Dendriten viele Filopodien, die innerhalb weniger Minuten auswachsen und wieder zurückgebildet werden können (Dailey und Smith, 1996; Dunaevsky et al., 1999; Lendvai et al., 2000; Ziv und Smith, 1996). Während der Entwicklung nimmt die Anzahl der Filopodien ab, während die der spineähnlichen Strukturen zunimmt, was vermuten läßt, daß die Filopodien die Vorläufer der Spines sind. Ziv und Smith (1996) gelang es erstmals die Bildung des Kontakts zwischen dendritischen Filopodien und nahegelegenen Axonen, an dissoziierten hippocampalen Neuronen, in Echtzeit zu zeigen. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde eine Abfolge von Ereignissen postuliert, bei der Filopodien auf Axone treffen, den synaptischen Kontakt herstellen und der Transformation zum Spine unterliegen. Diese Transformation beinhaltet die Verringerung der Beweglichkeit und Länge des Filopodiums. Außerdem wird das distale Ende des Filopodiums lokal verdickt bis die pilzförmige Gestalt eines reifen Spines erreicht ist, der typischerweise aus Kopf und Hals besteht (Abb. 1.4 und 1.5). Neuere Daten, gewonnen durch Live-Aufnahmen an sich entwickelnden Neuronen in hippocampalen Schnitten, wie auch *in vivo* im Neocortex, unterstützen die Hypothese, daß durch die Ausbildung von Synapsen, die Transformation von Filopodien in Spines ausgelöst wird (Dailey und Smith, 1996; Maletic-Savatic et al., 1999; Marrs et al., 2001; Trachtenberg et al., 2002). Gemäß diesem Modell besteht die Aufgabe der hoch motilen Filopodien darin, die Umgebung der Dendriten nach einem adäquaten Kontakt zu einem Axon zu sondieren. Zum Beispiel fördert der Neurotransmitter Glutamat das Auswachsen der Filopodien (Portera-Cailliau et al., 2003). Andere Signale, welche die Bewegung der Filopodien und deren selektive Adhäsion an kompatible Axone steuern könnten, sind Lenkungs- und Zelladhäsionsmoleküle auf den sich entwickelnden Filopodien und Axonen.

### *Spinebildung am dendritischen Schaft*

Das Modell, daß Spines an Synapsen entstehen, die sich ursprünglich am dendritischen Schaft gebildet haben, entstammt der Beobachtung, daß sich die Mehrzahl der Synapsen junger Pyramidenzellen am dendritischen Schaft befinden und nicht an den Filopodien (Harris et al., 1992). Während der Reifung des neuronalen Netzwerkes nimmt die Anzahl der Synapsen an den Spines zu und die der Schaftsynapsen ab. In diesem Model sind es die axonalen Filopodien und nicht die Dendritischen, die den entsprechenden Partner für den synaptischen Kontakt auffinden. Fiala et al. (1998) konnte mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen

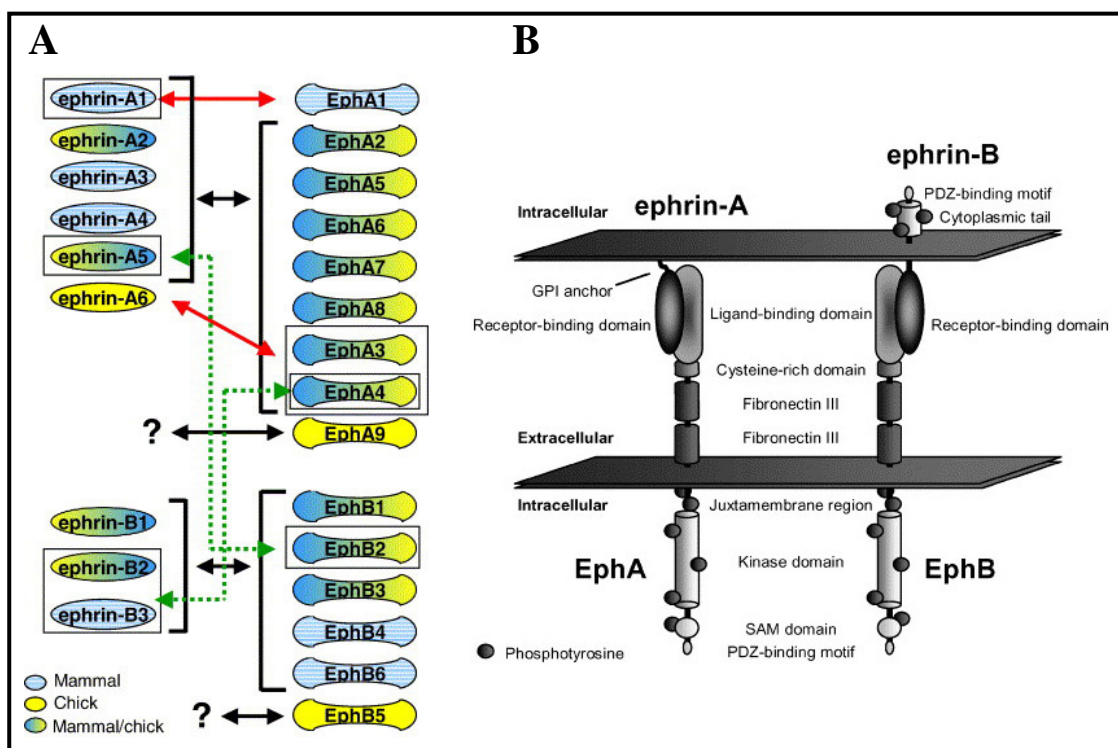
zeigen, daß axonale Filopodien in synaptischen Kontakt mit dem dendritischen Schaft stehen. Weiterhin dokumentieren Live-Aufnahmen von Pyramidenzellen in hippocampalen Schnitten die Entwicklung von Spines an Schaftsynapsen (Dailey und Smith, 1996; Marrs et al., 2001). Somit scheint es, daß sich zumindest *in vitro* Spines sowohl aus Filopodien entwickeln können als auch direkt am dendritischen Schaft entstehen. Allerdings ist nicht bekannt, ob ein spezieller Mechanismus *in vivo* überwiegt.

#### *Spinebildung ohne synaptischen Kontakt*

In beiden vorher besprochenen Modellen, die auf Studien an Pyramidenzellen basieren, induziert die Bildung eines synaptischen Kontakts die Entwicklung dendritischer Spines. Allerdings scheint es so, daß eine präsynaptische Seite nicht unbedingt für die Spinebildung erforderlich ist. An Purkinjezellen des Cerebellums gibt es spineartige Fortsätze, deren Entwicklung nicht von einem axonalen Kontakt abhängig ist, sondern durch einen intrinsischen Mechanismus ausgelöst wird. Die Spines an den distalen Verzweigungen des Dendritenbaums bilden sich, bevor ein synaptischer Kontakt mit den präsynaptischen Parallelfasern entsteht (Sotelo, 1990; Takacs et al., 1997). Weiterhin bilden Mausmutanten, denen diese Parallelfasern fehlen, an den Purkinjezellen morphologisch normale Spines aus. Wahrscheinlich entstehen also dendritische Spines an verschiedenen Neuronentypen auf unterschiedliche Art und Weise (Carlin et al., 1980; Mundel et al., 1997; Rao et al., 1998; Sekerkova et al., 2003; Wyszynski et al., 1998).

### 1.3. Das *ephrin*/*Eph*-System

Die *Eph*-Rezeptoren bilden die größte bekannte Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Ihr Name leitet sich von der Erythropoetin produzierenden humanen hepatozellulären Karzinoma-Zelllinie ab, aus der Hirai et al. (1987) den ersten Vertreter isoliert hat. Seitdem wurden in Vertebraten 15 *Eph*-Rezeptoren und 9 *ephrin*-Liganden (***Eph*-Rezeptor interagierendes Protein**) identifiziert (Martinez und Soriano, 2005). Die Rezeptoren und Liganden werden entsprechend ihrer Sequenzhomologien und Bindungsaffinitäten in A- und B-Klassen unterteilt (Abb. 1.6 A) (Gale et al., 1996).



**Abb. 1.6:** Klassifizierung, Bindungsspezifitäten und struktureller Aufbau der *Eph*-Rezeptoren und *ephrin*-Liganden. (A) Ungeachtet einiger besonders hoch affiner Ligand/Rezeptor-Interaktionen (rote Pfeile) sind die meisten Bindungen innerhalb einer Klasse promiskuitiv (schwarze Pfeile). Zusätzlich gibt es zwei Ausnahmen einer klassenübergreifenden, niedrig affinen Bindung (grüne Pfeile). (B) Während die *ephrinA*-Liganden durch einen GPI-Anker mit der Membran verbunden sind, haben die B-*ephrine* eine transmembranale Domäne und einen zytoplasmatischen Abschnitt mit einem PDZ-Bindemotiv. Die *Eph*-Rezeptoren besitzen eine konservierte Domänenstruktur, welche die zytoplasmatische Kinase mit einschließt. Nach Martinez und Soriano (2005).

### 1.3.1. Aufbau der *ephrine* und *Eph*-Rezeptoren

Der extrazelluläre Bereich der *Eph*-Rezeptoren besteht aus einer hochkonservierten N-terminalen globulären Domäne, an der die Liganden binden (Labrador et al., 1997). Dem schließt sich eine cysteinreiche Region und zwei Fibronectin Typ III Domänen an, welche die Rezeptor-Dimerisierung (Lackmann et al., 1998) und die Interaktion mit anderen Proteinen vermitteln (Dalva et al., 2000). Intrazellulär ist die Kinasedomäne durch eine Juxtamembran-Region von der Zellmembran separiert. Das carboxyterminale Ende enthält ein steriles  $\alpha$ -Motiv und eine Bindungsstelle für Proteine mit einer PDZ-Domäne (Abb. 1.6 B) (Torres et al., 1998).

Die *ephrin*-Liganden besitzen am N-Terminus eine Rezeptor-Bindedomäne, die von der Zellmembran durch ca. 40 Aminosäuren getrennt ist. Während die *A-ephrine* über einen Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker mit der Membran verbunden sind, besitzen die *B-ephrine* dagegen eine Transmembranregion und eine hoch konservierte, ca. 80 Aminosäuren lange, zytoplasmatische Domäne, die am C-Terminus ein PDZ-Bindemotiv enthält (Song et al., 2002; Torres et al., 1998).

### 1.3.2. *ephrin*/*Eph*-Interaktionen und Signaltransduktion

Die Liganden einer Klasse können mit allen Rezeptoren derselben Klasse interagieren (Gale et al., 1996). Dabei werden die Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten von den verschiedenen Rezeptoren gebunden (Flanagan und Vanderhaeghen, 1998). Allerdings gibt es auch Ausnahmen von dieser Regel. Es wurden auch schon klassenübergreifende Bindungen beschrieben. So bindet zum Beispiel *EphA4* verschiedene B-Liganden (Gale et al., 1996) und *ephrinA5* aktiviert den *EphB2*-Rezeptor (Abb. 1.6 A) (Himanen et al., 2004).

Diese *ephrin*/*Eph*-Interaktionen induzieren Signalkaskaden, welche die Morphologie und Motilität der Zellen sowie die axonale Lenkung steuern. Die zellulären Antworten resultieren allerdings aus bidirektionalen Signalen des Liganden-Rezeptor-Komplex'. Somit kann jede Komponente als Ligand oder Rezeptor wirken (Bruckner et al., 1999; Davy und Robbins, 2000; Holland et al., 1996). Bis jetzt sind drei Arten der Aktivierung bekannt: *forward*, *reverse* und *cross-talk-signaling* (Abb. 1.7).

#### *forward signaling*

Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt über zwei Schritte. Zunächst erfolgt eine monovalente Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor. Diese Heterodimere lagern sich zu Tetrameren zusammen. Dabei kommt es zu Konformationsänderung an der globulären Domäne der Rezeptoren, wodurch sich die intrazellulären Domänen annähern. Das ist Voraussetzung für

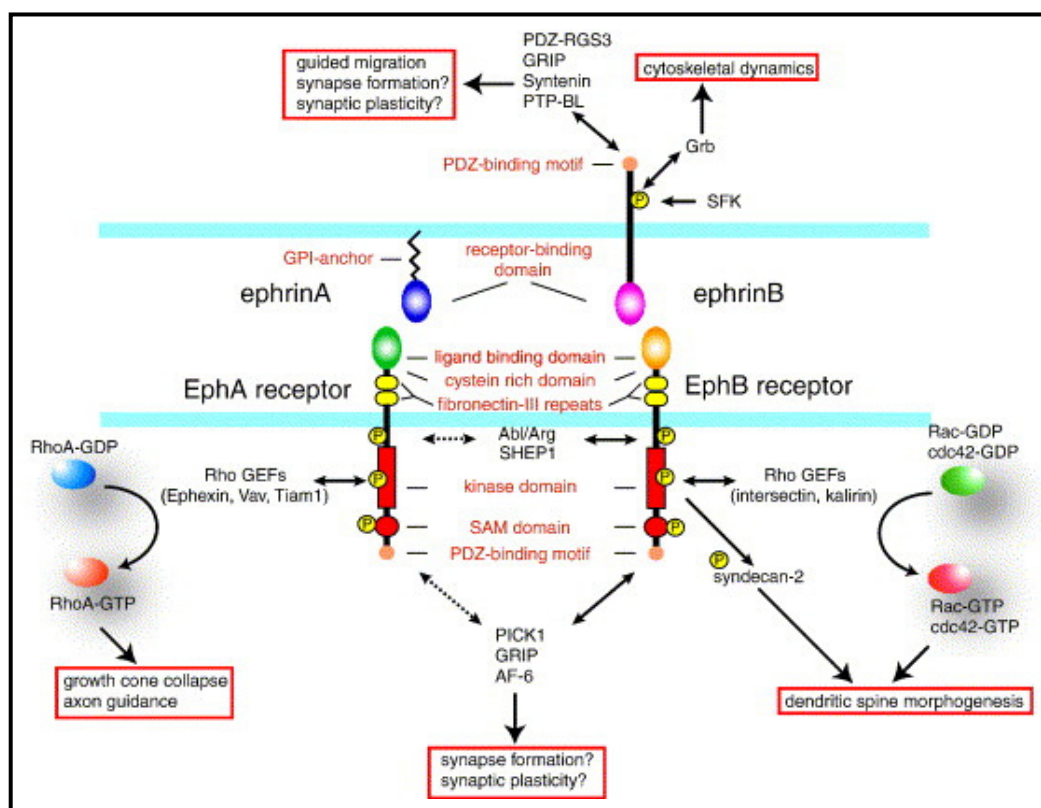


die Trans-Autophosphorylierung der Kinasedomänen, die dadurch vollständig aktiviert werden (Pasquale, 2005). Die aktive Kinase kann dann durch Phosphorylierung anderer Moleküle die Signalkaskade einleiten. Zu den nachgeschalteten Molekülen gehören Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, die *Src*-homologe (SH) Domänen 2 und 3 enthalten, wie zum Beispiel *Fyn*. *Fyn* stellt ein Mitglied der *Src family kinases* (*SFK*) dar, das über zwei hochkonservierte phosphorylierte Tyrosinreste an die juxtamembranale Region der *Eph*-Rezeptoren bindet (Zisch et al., 1998). Durch die Bindung der *SFKs* an die *Eph*-Rezeptoren können diese wiederum die Funktion und/oder die Bindungsaffinität anderer Signalmoleküle modulieren, zum Beispiel Bestandteile des *Integrin-Adhäsions-Komplex*’, *Neural-Wiskott Aldrich Syndrom Protein* (*N-WASP*) oder *Cortactin* (Aktivatoren des *Arp2/3* Komplex’) (Abram und Courtneidge, 2000). Weitere *downstream*-Moleküle, die durch die Tyrosinkinase direkt oder kinaseunabhängig durch das PDZ-Bindemotiv des Rezeptors aktiviert werden, sind die *guanine-nucleotide exchange factors* (*GEF*) *Ephexin*, *Tiam1*, *Intersectin* und *Kalirin*. Diese wiederum modulieren auf unterschiedliche Weise die GTPasen der *Rho*-Familie, wie z.B. *RhoA*, *Rac1* und *Cdc42*, welche die Actin-Dynamik des Zytoskeletts regulieren (Irie und Yamaguchi, 2002; Penzes et al., 2003; Shamah et al., 2001; Tanaka et al., 2004). So führt die Aktivierung von *Ephexin* durch *EphA*-Rezeptoren zur *RhoA*-Aktivierung und Inhibierung von *Rac1* und *Cdc42*, was den Kollaps axonaler Wachstumskegel zur Folge hat (Shamah et al., 2001). Dagegen führt die Aktivierung von *Tiam1* durch *EphA2* sowie von *Intersectin* und *Kalirin* durch *EphB*-Rezeptoren zur Aktivierung von *Rac1* und *Cdc42*, wodurch das Auswachsen von Neuriten und die Spineentwicklung stimuliert wird (Irie und Yamaguchi, 2002; Penzes et al., 2003; Tanaka et al., 2004).

#### *reverse Signaling*

Im Gegensatz zum *forward signaling* wird dieser Prozeß durch aktivierte *ephrin*-Liganden ausgelöst. Durch die Bindung der B-*ephrine* an die *EphB*-Rezeptoren, kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosinreste an der zytoplasmatischen Domäne des Liganden (Bruckner et al., 1997; Holland et al., 1996). Die Phosphorylierung wird durch Tyrosinkinasen der *Src* Familie vermittelt und führt zur Aktivierung von SH-Adapterproteinen, wie *Grb4*, was letztendlich in der Umstrukturierung des Zytoskeletts resultiert (Cowan und Henkemeyer, 2001). Weiterhin können die B-Liganden über ihr PDZ-Bindemotiv, Proteine des *Postsynaptic Density*, die eine PDZ-Domäne enthalten, wie das *Glutamate Rezeptor Binding Protein* (*GRIP*) 1 und 2 oder *Syntenin*, binden (Bruckner et al., 1999; Torres et al., 1998) und somit wichtig für die Ausbildung und Plastizität von Synapsen sein (Grunwald et al., 2004).

Überraschenderweise können auch *ephrinA*-Liganden, die keine zytoplasmatische Domäne aufweisen und nur über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden sind, ein *reverse signaling* auslösen. Sie kommen in cholesterolreichen Membrandomänen, den *lipid rafts*, vor, in denen sie sich mit anderen Proteinen zu Komplexen zusammen lagern und intrazelluläre Signale transduzieren können. So wurde gezeigt, daß die Aktivierung von *A-ephrinen* zur Rekrutierung der *Src*-Kinase *Fyn* in die *lipid rafts* (Davy et al., 1999) und zu einer Zunahme der Integrin-vermittelten Zelladhäsion führt (Huai und Drescher, 2001).



**Abb. 1.7:** Schematische Darstellung der Interaktionen, die im *forward* und *reverse signaling* involviert sind. Nach Aoto und Chen (2006).

### *cross-talk-signaling*

Zusätzlich zu den komplexen bidirektionalen *ephrin/Eph*-Signalen gibt es auch die Interaktionen der *Eph*-Rezeptoren mit einer großen Anzahl anderer Proteine auf der Zelloberfläche. So induziert zum Beispiel die Aktivierung von *EphB2* durch *ephrinB1* eine direkte Interaktion von *EphB2* mit dem *NMDA*-Rezeptor (Dalva et al., 2000). Durch diese Interaktion, vermittelt durch die extrazellulären Domänen der beiden Rezeptoren, kommt es zur Aktivierung von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der *Src*-Familie, die den *NMDA*-

Rezeptor phosphorylieren, was letztendlich zu einer Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromes führt (Grunwald et al., 2001; Salter und Kalia, 2004).

Nicht zuletzt durch diese Interaktion mit dem *NMDA*-Rezeptor spielt das *ephrin/Eph*-System auch eine zentrale Rolle in der Spineentwicklung und der synaptischen Plastizität.

### **1.3.3. Die Bedeutung des *ephrin/Eph*-Systems während der Entwicklung**

Wie die Vielzahl von Signaltransduktionswegen schon andeutet, spielen die *ephrine* und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle in den verschiedensten Entwicklungsprozessen des Nervensystems. Dabei wird es vor allem als ein System mit repulsiver Wirkung beschrieben (Klein, 2004; Kullander und Klein, 2002; O'Leary und Wilkinson, 1999).

Die Rolle der *ephrine* als axonale Lenkungsmoleküle wurde zuerst an der Entwicklung der retinalen Projektionen intensiv untersucht. Frühe Arbeiten von (Drescher et al., 1995) zeigten die Expression von *ephrin*-Gradienten im optischen Tectum. Mittlerweile wird davon ausgegangen, daß die *ephrine* und *Eph*-Rezeptoren durch die Expression entgegengesetzter Gradienten im optischen Tectum und der Retina, für die Ausbildung der spezifischen topographischen Karte verantwortlich sind. Während es in der Retina eine zunehmende Expression von *EphA*-Rezeptoren entlang der nasal-temporalen Achse gibt, werden *ephrinA2*, *A5* und *A6* in zunehmenden Maße entlang der anterior-posterioren Achse des Tectums exprimiert. So stoppen und verzweigen die Axone der retinalen Ganglienzellen, die in Abhängigkeit ihres Ursprungs entlang der nasal-temporalen Achse einen spezifischen Level an *EphA*-Rezeptoren exprimieren, entsprechend der Konzentration der Liganden, die sie im Tectum vorfinden. Das bedeutet, die temporalen retinalen Axone, die viel Rezeptor exprimieren, stoppen schon im anterioren Bereich des Tectums, in dem die Konzentration der Liganden noch niedrig ist und die nasalen retinalen Axone mit wenig Rezeptor erst im posterioren Bereich des Tectums, wo die Ligandenkonzentration hoch ist [Übersicht in (Martinez und Soriano, 2005)].

Die Organisation der thalamocorticalen Topographie, sowohl der intra-arealen, als auch der inter-arealen, kommt durch ähnliche Mechanismen zustande. Den Einfluß des *ephrin/Eph*-Systems auf die intra-areale Organisation der thalamischen Fasern konnte Vanderhaeghen et al. (2000) für den somatosensorischen Cortex zeigen. Mit *in-situ*-Hybridisierung, bei den Altersstufen E18 bis P3, wurde von medial nach lateral abfallend ein *ephrinA5*-Gradient in der corticalen Platte und im Thalamus ein *EphA4*-Gradient von ventromedial nach dorsolateral nachgewiesen. Dabei projizieren die thalamischen Axone mit der höchsten

Konzentration von *EphA4*-Rezeptor in S1 nach lateral, wo die Konzentration von *ephrinA5* gering ist. Das läßt vermuten, daß die somatotope Karte, ähnlich wie die retinotektale Projektion, durch eine repulsive Ligand-Rezeptor-Interaktion zustande kommt.

Gleichermaßen ist auch die inter-areale topographische Organisation vom *ephrin/Eph*-System abhängig. So werden die Rezeptoren *EphA3*, *A4* und *A5* in den Altersstufen E13 bis E15 im dorsalen Thalamus exprimiert und bilden einen abnehmenden Gradienten von rostromedial nach caudolateral. Zur selben Zeit besteht ein komplementärer *ephrinA5*-Gradient im ventralen Telencephalon (Dufour et al., 2003). Dies könnte für das Vorsortieren der thalamischen Axone verantwortlich sein, nachdem sie den Thalamus verlassen haben und durch das ventrale Telencephalon in Richtung Cortex wachsen. Die thalamischen Fasern von Neuronen der anterioren Kerne, welche eine hohe Konzentration von *EphA*-Rezeptoren aufweisen, vermeiden den posterioren Cortex, wegen der hohen Konzentration von *ephrinA5* im posterioren ventralen Telencephalon. Diese frühe Segregation der Fasern, entsprechend ihrer sensorischen Modalität, von anterior nach posterior ist Voraussetzung für eine korrekte Innervation der spezifischen corticalen Areale.

Weiterhin wird *ephrinA5* in der *subplate* und der corticalen Platte von verschiedenen neocorticalen Arealen exprimiert, aber nicht in den benachbarten limbischen corticalen Regionen, in denen *LAMP* exprimiert wird (Gao et al., 1998; Mackarehtschian et al., 1999; Vanderhaeghen et al., 2000). *In-vitro*-Experimente konnten zeigen, daß *ephrinA5* repulsiv auf Axone wirkt, die normalerweise limbische corticale Areale innervieren, aber keinen repulsiven Effekt auf thalamische Fasern ausübt, die in neocorticale Areale projizieren (Mann et al., 2002). *In vivo* weist die *ephrinA5*-Knockout-Maus am postnatalen Tag 8 fehlgeleitete Projektionen vom dorsomedialen Thalamus in die S1-Region des Cortex auf. Das Fehlen von *ephrinA5* führt also dazu, daß thalamische Fasern, welche normalerweise limbische Teile des Cortex innervieren, nun in die benachbarten neocorticalen Areale einwachsen können (Uziel et al., 2002). Später in der Entwicklung, zwischen P14 und P18, konnte Dufour et al. (2003) diese fehlerhaften Verknüpfungen in der *ephrinA5*-Knockout-Maus nicht mehr nachweisen, was suggeriert, daß diese falschen Verbindungen transient sind und im Verlauf der Entwicklung wieder eliminiert werden.

Im Gegensatz zu diesen repulsiven Effekten besitzt *ephrinA5* aber auch attraktive Wirkungen. *In-situ*-Hybridisierungen haben gezeigt, daß *ephrinA5* zu einem Zeitpunkt stark in Schicht 4 und schwächer in Schicht 6 exprimiert wird, wenn sich intracorticale Verschaltungen ausbilden und sich die thalamischen Afferenzen im Cortex verzweigen (Castellani et al.,

1998; Mann et al., 2002). Erstmals von Castellani et al. (1998) nachgewiesen, fördert *ephrinA5* das axonale Verzweigen einer Subpopulation corticaler Neurone. Die Pyramidenzellen der Schicht 6 bilden *in vitro* mehr Axonkollaterale auf einem *ephrinA5*-Substrat aus, als auf dem Kontrollsubstrat. Die Axone dieser Neurone verzweigen sich *in vivo* in Schicht 4, in der *ephrinA5* exprimiert ist. Das zeigt, daß *ephrinA5* auch für die Ausbildung intracortikaler Verschaltungen notwendig ist.

Ebenso wirkt es auf thalamische Axone, die hauptsächlich in Schicht 4 terminieren und zum Teil in Schicht 6. *In vitro* fördert *ephrinA5* die Verzweigung der thalamischen Axone, welche in die neocorticalen Areale projizieren (Mann et al., 2002). In Übereinstimmung dazu, zeigen *in-vivo*-Experimente, daß die Schichtspezifität der thalamischen Afferenzen in der *ephrinA5*-Knockout-Maus erhalten bleibt, aber die Anzahl und Länge der Axonkollateralen deutlich reduziert ist (Mühlfriedel, 1999). *EphrinA5* ist also kein Stop-Signal für thalamische Axone, aber es reguliert deren Verzweigung in der korrekten corticalen Schicht.

## 2. Zielstellung

Die *ephrine* und ihre *Eph*-Rezeptoren beeinflussen auf vielfältige Weise die Entwicklung der Neurone und die Ausbildung neuronaler Netze. So führt das Fehlen von *ephrinA5* zum Beispiel dazu, daß sich die thalamischen Fasern in der Schicht 4 des somatosensorischen Cortex (S1) der Maus weniger verzweigen (Mühlfriedel, 1999). Ebenso wird die Entwicklung der Dendriten und Spines unter anderem durch das *ephrin/Eph*-System gesteuert (Ethell und Pasquale, 2005; Scott und Luo, 2001).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, welche Auswirkungen das Fehlen von *ephrinA5* und der damit einhergehende reduzierte thalamische Input auf die Zielzellen der Afferenzen, die Sternzellen in der Schicht 4, hat. Dazu wurde zunächst die Methode des *diolistic labeling*, bei der farbstoffbeschichtete Wolframpartikel mit der *Gene-Gun* auf das zu markierende Gewebe geschossen werden (Gan et al., 2000), so abgewandelt, daß es für die Markierung der Sternzellen geeignet war. Dabei ergaben sich folgende Fragen:

- Dringen die Wolframpartikel tief genug in die Gehirnschnitte ein, damit auch komplette Sternzellen gefärbt werden?
- Lassen sich die Neurone möglichst vereinzelt stehend anfärben, damit sich die Details der Dendritenbäume auswerten lassen?
- In welchem Gewebe lassen sich die Zellen besser markieren, im lebenden oder perfundierten?

Nach Auswahl der besten Methode für die Markierung der Neurone, sollten diese mit dem Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen und nach folgenden Gesichtspunkten quantitativ analysiert werden:

- Welchen Einfluß hat *ephrinA5* auf die Ausbildung der Filopodien bzw. Spines der Sternzellen?
- Gibt es einen Einfluß auf die Länge und die Anzahl der Verzweigungen der Dendriten?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Versuchstiere

Alle Experimente wurden an *ephrinA5*-Knockout-Mäusen (Zarbalis, 2000) sowie dem entsprechenden Wildtyp-Stamm C57BL/6J durchgeführt. Die Zucht erfolgte im eigenen Institut in einem klimatisierten Raum und 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Verwendet wurden Mäuse der Altersstufen E15 - E17, P0 - P8 und P23, wobei E1 der Tag nach der Paarungsnacht und P0 der Tag der Geburt war.

##### 3.1.2. Oligonukleotid-Primer

Die folgenden Primer für die Genotypisierung wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Die Sequenzen sind in 5' zu 3' Richtung angegeben.

- *EfnA5*-wt\_for      CAC ATT GAT GTC TGT ATC AAT GAC TAC C
- *EfnA5*-wt/mt\_rev    CAA GGA GAC ATC TGT AAC ACA GAG TCC
- *EfnA5*-mt-short\_for   CGA TCC GTC CTG TAA GTC TGC

Die Größe der PCR-Produkte betrug für den Wildtyp 402 bp und für die Mutante 640 bp.

##### 3.1.3. Enzyme

Name	Hersteller	Enzymtyp	Aktivität
HOTSTAR <i>Taq</i> DNA POLYMERASE	QIAGEN	DNA-abhängige-DNA- Polymerase	5U/μl
Proteinase K	SIGMA	Serin-Protease	36U/mg

**3.1.4. Chemikalien**

<b>Name</b>	<b>Firma</b>
100 bp Ladder	MBI FERMENTAS
6x Loading Dye Solution	MBI FERMENTAS
Agarose	ROTH
Agarose low melt	ROTH
Borsäure	SIGMA
CaCl <sub>2</sub>	SIGMA
Chloralhydrat	SIGMA
Chloroform	ROTH
DAPI	MOLECULAR PROBES
DiA	MOLECULAR PROBES
Dichlormethan	ROTH
DiI	MOLECULAR PROBES
DMEM/F12	INVITROGEN
dNTP	SIGMA
EDTA	BOEHRINGER MANNHEIM
Ethanol	ROTH
Ethidiumbromid	ROTH
Glucose	SIGMA
HBSS	INVITROGEN
HCl	ROTH
Isopropanol	ROTH
KCl	SIGMA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	SIGMA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	SIGMA
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	SIGMA
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	SIGMA
Mowiol	CALBIOCHEM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	SIGMA
NaCl	SIGMA
NaHCO <sub>3</sub>	SIGMA



NaOH	SIGMA
Paraformaldehyd	MERCK
Penicillin/Streptomycin	GIBCO BRL
Poly-L-Lysin	SIGMA
Polyvinylpyrrolidone	BIO RAD
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	ROTH
TRIS	ROTH
Wolframkugeln	BIO RAD

### 3.1.5. Gase

Alle verwendeten Gase waren von der Firma LINDE.

Name	Reinheit
Carbogen (95% O <sub>2</sub> und 5% CO <sub>2</sub> )	geeignet zur Inhalation
Kohlendioxid	4,5
Helium	4,6
Stickstoff	5,0

### 3.1.6. Geräte

Name	Firma
2 Photonen Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop - LSM 510	ZEISS
DNA-Elektrophoresekammer (horizontal)	GIBCO BRL
Electrophoresis Power Supply	GIBCO BRL
Gel-Dokumentationssystem	MWG BIOTECH
Heizplatte MR3001	HEIDOLPH
Helios <i>Gene-Gun</i> -System	BIO RAD
Hot-beat-Sterilisator	FINE SCIENCE TOOLS
Inkubator HERA cell	HERAEUS
Kaltlichtquelle KL1500	SCHOTT
Laminarbox HERA SAFE	HERAEUS
Mastercycler Gradient	EPPENDORF

Minischüttler MS2	SCHÜTT
petriPERM 50 hydrophilic	SATORIUS
pH-Meter 765 CALIMATIC	KNICK
Stereomikroskop	ZEISS
<i>tefzel-tubing</i>	BIO RAD
Thermomixer Compact	EPPENDORF
Tissue Chopper	MC ILWAIN; MICKLE LABORATORY ENGINEERING CO
UV-Visible Spektrophotometer UV-1601	SHIMADZU
Vibrating Microtom	TSE GmbH
Zentrifuge 5804R	EPPENDORF

### 3.2. Puffer und Stammlösungen

- **10x PBS:** 80g NaCl; 2g KCL; 2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (wasserfrei); 11,5g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (wasserfrei) mit Bidest auf 1l auffüllen
- **10x TBE-Puffer:** 109g TRIS; 55,65g Borsäure, 2,92g EDTA mit Aqua dest. auf 1l auffüllen
- **1x PBS:** 10x PBS mit Bidest 1:10 verdünnen und den pH-Wert kontrollieren (pH 7,4); für sterile Arbeiten das PBS autoklavieren (20min, 121°C bei 2 bar), Lagerung bei 4°C
- **Chloralhydrat:** 3,5g Chloralhydrat wurde in 50ml PBS gelöst und sterilfiltriert (Ultrafilteraufsätze von SCHLEICHER UND SCHUELL, Porengröße: 0,2 µm)
- **DAPI-Stammlösung:** 50µg DAPI; 100ml Bidest
- **Ethidiumbromid-Stammlösung (ROTH):** 10mg/ml
- **Fixativ:** 40g Paraformaldehyd in 700ml Bidest auf 60°C erwärmen, 1M NaOH zutropfen bis das Paraformaldehyd gelöst ist, die Lösung auf RT abkühlen lassen, 100ml 10x PBS und 1g EDTA dazugeben, mit 1M HCL auf pH 7,4 einstellen, mit Bidest auf 1l auffüllen, zu je 50ml aliquotieren und bei -20°C lagern

- **GBSS:** 16g NaCl; 0,34g CaCl<sub>2</sub>; 0,54g KCl; 0,06g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,42g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 0,14g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 0,454g NaHCO<sub>3</sub>; 0,238g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2g Glucose in 2l Bidest lösen und pH-Wert kontrollieren (pH 7,4)
- **GBSS/Glc:** 50ml GBSS; 0,5ml 65%ige Glucose
- **HBSS/Glc:** 50ml HBSS; 0,5ml 65%ige Glucose
- **Lysepuffer:** 5ml 1M Tris/HCl pH 8,5; 500µl 500mM EDTA; 500µl 20%iges SDS; 2ml 5M NaCl mit sterilem Bidest auf 50ml auffüllen
- **Medium für embryonale Schnitte:** 60ml DMEM/F12 (ohne Phenolrot); 30ml HBSS (ohne Phenolrot); 10ml FBS, 1ml Penicillin/Streptomycin; 1ml 65%ige Glucose
- **Proteinase-K-Lösung:** 20mg/ml wurde immer frisch mit sterilem Bidest angesetzt
- **TE-Puffer:** 500µl 1M Tris/HCl pH 8,5; 100µl 500mM EDTA mit sterilem Bidest auf 50ml auffüllen

### 3.3. Methoden

#### 3.3.1. Genotypisierung

##### Isolierung genomischer DNA

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Arbeitsschritte bei RT durchgeführt. Zur Kontrolle der *ephrinA5*-Knockout-Mäuse wurde diesen ein 0,5 bis 1cm langes Stück vom Schwanz abgeschnitten und in ein Eppendorf-Tube mit 210µl Lysepuffer und 40µl Proteinase-K-Lösung gegeben. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 55°C und 350rpm in einem Thermomixer. Zur besseren Homogenisation des Gewebes wurde nach dem Verdau noch 450µl Lysepuffer dazu gegeben und bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext bis das Gewebe vollständig gelöst war. Zu diesem Lysat wurden 700µl PCI-Gemisch gegeben und so lange geschüttelt bis sich beide Phasen vollständig vermischt hatten. Zum Trennen der beiden Phasen wurde 20min bei 3000g zentrifugiert. Von der oberen wässrigen Phase, welche die DNA enthielt, wurden 600µl abgenommen und nochmals mit 600µl Chloroform vollständig vermischt. Zentrifugiert wurde wieder 20min bei 3000g. Zur Fällung der DNA wurden 550µl der oberen Phase abgenommen, mit 2,5 Volumen absoluten EtOH versetzt, vorsichtig durchmischt und 10min bei RT inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 3000g wurde der Überstand abgenommen, das DNA-Pellet mit 1ml 70%igem EtOH gewaschen und 15min bei 3000g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet getrocknet und

anschließend in 200µl TE über Nacht bei 50°C gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte in TE-Puffer (1:10 Verdünnung) bei 260nm gemessen. Der Reinheitsgrad der isolierten DNA ermittelte sich aus dem Quotienten der optischen Dichten, gemessen bei 280nm und 260nm. Außerdem wurde die Qualität der isolierten DNA mittels Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 10µl DNA mit 2µl 6xLadepuffer versetzt, auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei einer Feldstärke von 8V/cm in TBE-Puffer aufgetrennt. Um die DNA in dem Gel sichtbar zu machen, wurde dem Gel, schon beim gießen, EtBr in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml zugegeben. Fotografiert wurde das Gel in einem Gel-Dokumentationssystem.

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Primer für die Genotypisierung wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Der Primer *EfnA5-wt\_for* wurde in einer Endkonzentration von 0,1pmol/µl eingesetzt, während die Konzentration der zwei anderen Primer (*EfnA5-mt-short\_for* und *EfnA5-wt/mt\_rev*) 0,2pmol/µl betrug. Dies, sowie eine zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur durchgeführten Gradienten-PCR, ermöglichte die äquivalente Amplifikation der für den Wildtyp bzw. Mutante charakteristischen PCR-Produkte.

In ein Reaktionsvolumen von 25 µl wurden etwa 100ng genomische DNA, 2,5pmol bzw. 5pmol Primer, der *Taq*-Puffer sowie die Q-Solution in einfacher Endkonzentration (1x), 2,5nmol dNTP-Mix, 37,5 nmol MgCl<sub>2</sub> (ergab zusammen mit dem MgCl<sub>2</sub> aus dem *Taq*-Puffer eine Endkonzentration von 3mM) und 0,75U HotStar *Taq*-Polymerase gegeben.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

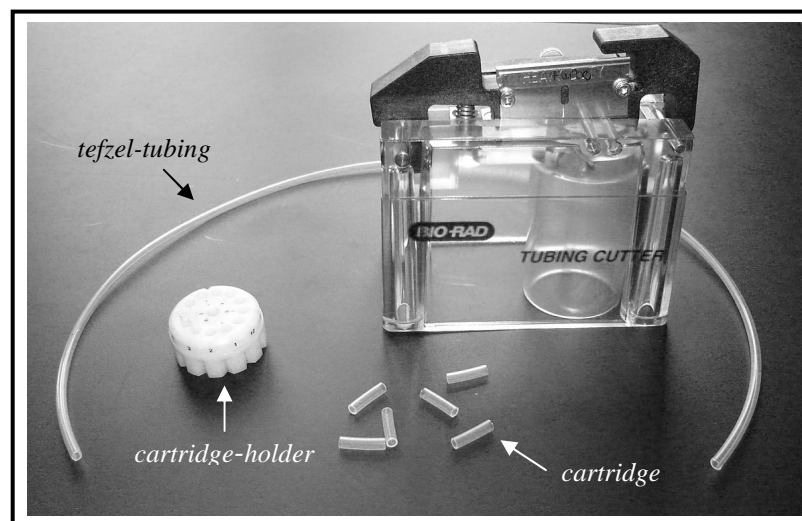
- |  |       |                         |
|--|-------|-------------------------|
| • Deckel   | 105°C |                         |
| • Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> -Polymerase | 95°C  | 15'                     |
| • Denaturierung                                  | 94°C  | 1'                      |
| • Annealing                                      | 56°C  | 45''                    |
| • Elongation                                     | 72°C  | 1'10''                  |
|  |       | <u>+ 1'' pro Zyklus</u> |
|  |       | 30 Zyklen               |
| • Hold   | 8°C   |                         |

Die Größe der PCR-Produkte betrug für den Wildtyp 402 bp und für die Mutante 670 bp.

### 3.3.2. Beschichtung von Wolframkugeln mit lipophilen Farbstoffen

Zum Beschichten der Kugeln wurden 0,3mg DiA bzw. 0,2mg DiI in 4ml Dichlormethan gelöst und 2,5mg Wolframkugeln, mit einem Durchmesser von  $1,7\mu\text{m}$ , dazugegeben. Zum Aufbrechen vorhandener Kluster und gleichmäßigem Verteilen der Wolframkugeln in der Farbstofflösung, kam das Gemisch für 30sec in ein auf maximale Leistung gestelltes Ultraschallbad und wurde anschließend in eine Glaspetrischale gegossen. Damit beim Verdampfen des Dichlormethans kein Wasser kondensierte, was die Verklumpung der beschichteten Kugeln begünstigt hätte, befand sich die Petrischale auf einer handwarmen Heizplatte. Nach dem Verdampfen des Dichlormethans konnten die nun mit Farbstoff beschichteten Kugeln mit einer Rasierklinge abgekratzt werden. Ein etwa 40cm langer Schlauch (*tefzel-tubing*) wurde von beiden Seiten trocken mit den Kugeln befüllt und solange gevortext, bis sich diese gleichmäßig verteilt hatten. Mit Hilfe des Tubing Cutters wurde der Schlauch in Stücke mit definierter Länge geschnitten. Diese Patronen lagerten im Dunkeln bei RT.

Für die Herstellung von Patronen, welche DiA und DiI enthielten, wurden 2 Petrischalen mit jeweils einem Farbstoff, wie oben beschrieben, angesetzt. Nach dem Abkratzen der Kugeln wurden diese vermischt und so aufgeteilt, daß 2 Schläuche befüllt werden konnten.



**Abb 3.1:** Mit Hilfe des Tubing Cutters wurden aus dem Schlauch (*tefzel-tubing*) die Patronen (*cartridge*) auf die Länge geschnitten, damit sie in die Patronentrommel (*cartridge-holder*) passen.

### 3.3.3. Gewebepräparation

#### Perfundiertes Gewebe

Mäuse der Altersstufen P1, P4, P8 und P23 wurden durch intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat (7%; P1-P8 0,2ml und P23 0,5ml) tief anästhesiert. Danach erfolgte eine transcardiale Perfusion, zunächst 30sec (P1-P8) bzw. 1min (P23) mit PBS (37°C) und anschließend 2min mit Fixativ (4% PFA mit 0,1% EDTA; 37°C), bei einer Durchflußrate von etwa 2ml/min (P1-P8) bzw. 5-8ml/min (P23). Nach der Perfusion wurden die Gehirne sofort entnommen, in 37°C warmer *low-melt*-Agarose eingebettet und nach dem Aushärten an einem Vibratom 200µm dicke Coronalschnitte angefertigt. Es fanden nur die Schnitte, welche aus der S1 Region stammten und unter dem Stereomikroskop die typische *Barrell*-Formation in Schicht 4 des Cortex aufwiesen, weitere Verwendung.

#### Lebendes Gewebe

Die an lebendem Gewebe durchgeführten Arbeiten, fanden unter sterilen Bedingungen statt. Alle verwendeten Materialien waren keimfrei und die Instrumente wurden in einem Hot-beat-Sterilisator bei 250°C sterilisiert.

Zur Gewinnung des postnatalen Gewebes wurden die Tiere dekapitiert. Ausschließlich die P23 Mäuse erhielten vor der Dekapitation intraperitoneal 0,5ml Chloralhydrat zur Anästhesie. Die Gehirne wurden sofort entnommen und der Cortex mittels unterschiedlicher Methoden präpariert:

1. Das Gehirn wurde sofort in 37°C warme low melt Agarose eingebettet, die bei 4°C aushärtete. Anschließend kam das Agaroseblöckchen in eine eisgekühlte mit GBSS/Glc. bzw. HBSS/Glc. gefüllten und mit Carbogengas belüfteten Schneidekammer und wurde mit dem Vibratom in 200µm dicke Coronalschnitte geschnitten.
2. Das Gehirn wurde nicht in Agarose eingebettet. Das Anfertigen der Schnitte erfolgte ansonsten, wie oben beschrieben.
3. Das Gehirn wurde sofort in eiskaltes GBSS/Glc. bzw. HBSS/Glc. überführt und der somatosensorische Cortex präpariert. Das Cortexstückchen wurde auf einen etwa halben Zentimeter dicken Agarblock gelegt und mit dem *brain-slicer* (Katz, 1987) 400µm dicke Schnitte angefertigt.

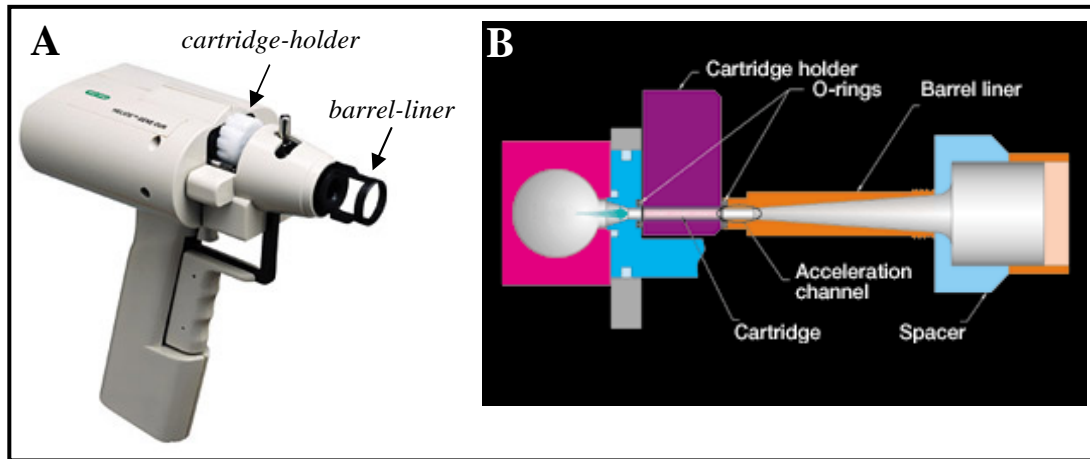
Zur Gewinnung embryonalen Gewebes (E15-E17) wurde eine trächtige Maus durch intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat (7%, 1ml) tief anästhesiert, die Embryonen

entnommen, die Gehirne frei präpariert und in eiskaltem GBSS/Glc aufbewahrt, bis die Präparation abgeschlossen war. Anschließend wurden die Gehirne in einem Winkel von 40° zur Mittellinie mit dem Tissue Chopper in 250µm dicke Schnitte gehackt.

#### **3.3.4. Ballistische Markierung von Zellen**

Nach dem Anfertigen der Schnitte, wurden diese in PBS (perfundiertes Gewebe) oder eiskaltem GBSS/Glc. bzw. HBSS/Glc. (lebendes Gewebe) aufbewahrt und möglichst schnell mit den farbstoffbeschichteten Wolframkugeln beschossen. Dazu wurden 12 Patronen in die Trommel geladen und diese in die *Gene-Gun* eingesetzt, welche wiederum senkrecht, in einem Abstand von 0,5 bis 1,5cm, über den zu beschießenden Schnitt gehalten wurde. Unmittelbar vor dem Schuß wurde die Flüssigkeit abgesaugt. Der Heliumdruck beim Schuß betrug 9bar bzw. 7,5bar bei embryonalen Schnitten. Die farbstoffbeschichteten Wolframkugeln lösten sich von der Innenwand der Patronen und wurden auf den Schnitt übertragen. Der *barrel-liner* verhinderte eine zu starke Streuung der Partikel und das Metallgitter im *barrel-liner* schützte das Gewebe vor dem hohen Gasdruck (Abb. 3.2). Nach dem Schuß wurde der Schnitt einmal mit der entsprechenden Salzlösung gespült und anschließend mit 4% PFA für 2h bei RT nachfixiert (perfundiertes Gewebe) oder für 5 bis 20min in HBSS/Glc bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und dann ebenfalls für 2h bei RT fixiert. Zum Anfärben der Zellkerne, wurde dem PFA DAPI in einer Verdünnung von 1:500 zugesetzt. Danach konnten die Schnitte mit Mowiol eingebettet werden.

Für die *time-lapse*-Untersuchung wurden die embryonalen Schnitte in mit Poly-L-Lysin beschichteten Petriperm-Schalen, die 3 ml Medium enthielten, überführt. Danach wurden 2ml Medium entnommen und die Schnitte zum Adhäreren für 5h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Präparation der embryonalen Schnitte wurde von Patricia Garcez durchgeführt.



**Abb. 3.2:** (A) Die Patronentrommel wird in die *Gene-Gun* eingespannt. Der *barrel-liner* fokussiert die austretenden Wolframpartikel. (B) Schematische Darstellung der Funktionsweise der *Gene-Gun*.

### 3.3.5. Laser-Scanning-Mikroskopie

#### Fixiertes Gewebe

Für die Aufnahmen der markierten Zellen wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510) von Zeiss benutzt. Dabei gewährleistete ein Wasser-Immersions-Objektiv (40x; 1,2 NA) eine große Eindringtiefe (durch die Wasserkorrektur des Objektivs) und hohe Auflösung (durch die große Numerische Apertur). Das Pinhole wurde so eingestellt, daß die Dicke eines optischen Schnittes 1µm betrug. Während für die Aufnahme von DiA markierten Zellen ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm und als Emissionsfilter ein Bandpass 500-550nm verwendet wurde, kam für die DiI markierten Zellen ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543nm und als Emissionsfilter ein Langpass 560nm zum Einsatz. Zur Darstellung der Schichten des Cortex', waren die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels 2-Photonen-Anregung des DAPIs durch einen Titan-Saphir-Laser (Mai Tai) bei einer Wellenlänge von 780nm und einem Bandpass 435-485nm mit Infrarotsperre als Emissionsfilter. Bei den Aufnahmen mit dem „Mai Tai“-Laser war das Pinhole ganz geöffnet, da die 2-Photonen-Anregung nur in der Focusebene stattfindet und das Fluoreszenzlicht somit konfokal ist. Bei mehrfarbigen Aufnahmen ist DAPI blau, DiA grün und DiI rot dargestellt.

#### Lebendes Gewebe

Für die *time-lapse*-Aufnahmen waren die Schnitte in beschichteten Petriperm-Schalen mit 2ml Medium und 6ml Mineralöl bedeckt. Für optimale Milieubedingungen befand sich die Petrischale in einer Inkubationseinheit mit 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Als Objektiv wurde ein Plan-

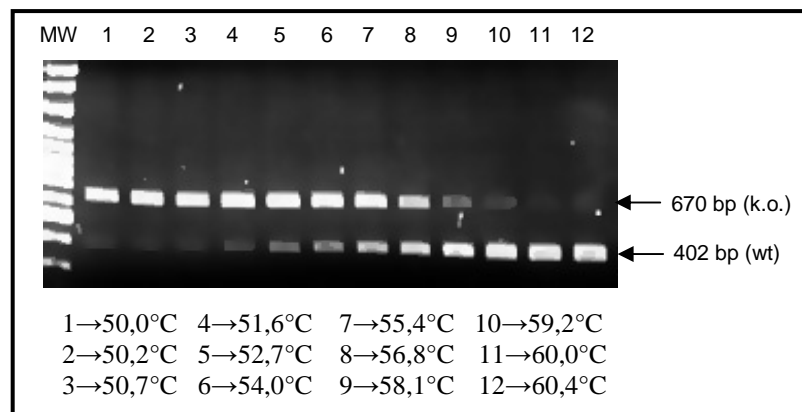


Apochromat (20x; 0,75 NA) verwendet. DiI markierte Zellen wurden, wie oben beschrieben, gescannt. Zum Schutz der Zellen war zum einen die Laserleistung so gering wie möglich eingestellt und zum anderen das Pinhole soweit geöffnet, daß sich eine optische Schichtdicke von 3µm ergab, was die Gesamtscanzeit verkürzte. Für DiA markierte Zellen konnte der Argonlaser sowie der „Mai Tai“-Laser verwendet werden. Die Aufnahmen mit dem Argonlaser erfolgten, wie oben beschrieben, ebenfalls mit den Ausnahmen, daß der Laser mit geringstmöglicher Leistung betrieben wurde und das Pinhole soweit geöffnet war, daß sich ein optischer Schnitt von 3µm ergab. Die Einstellungen für die Aufnahmen mit dem „Mai Tai“ waren folgendermaßen: die Anregungswellenlänge betrug 780nm, als Emissionsfilter wurde ein Bandpass 500-550nm verwendet und das Pinhole war ganz geöffnet. Die Zellen wurden für mindestens 12h alle 30min gescannt.

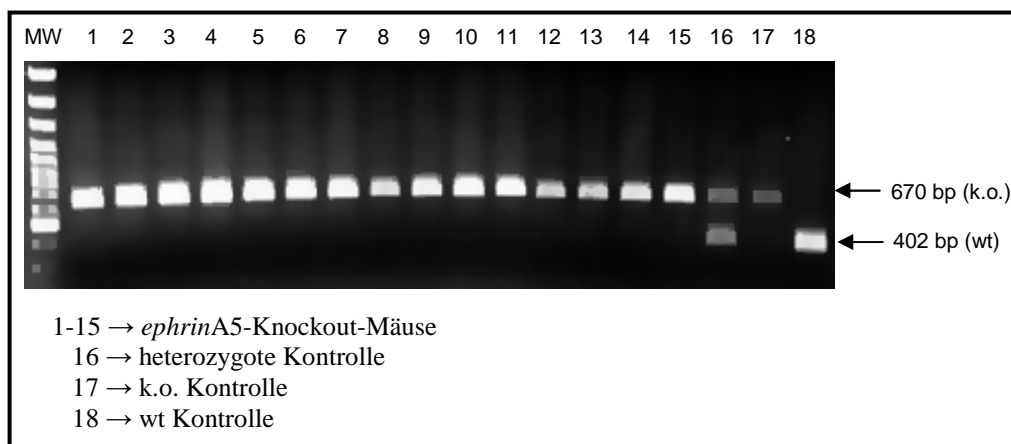
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Genotypisierung

Zur Kontrolle der *ephrinA5*-Knockout-Mäuse wurde die genomische DNA, wie unter 3.3.1. beschrieben, isoliert und mittels PCR geprüft. Um die äquivalente Amplifikation der für den Wildtyp bzw. Mutante charakteristischen PCR-Produkte zu gewährleisten, wurde zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur eine Gradienten-PCR mit genomischer DNA von heterozygoten Mäusen durchgeführt (Abb. 4.1). Die Größe der für die Mutante charakteristischen Bande liegt bei 670 bp und der für den Wildtyp bei 402 bp. Das Amplifikat der Mutante ist deshalb größer, da die Primer so gewählt wurden, daß ein Teil der Neomycin-Kassette, die über Rekombination in das *ephrinA5*-Gen eingefügt wurde, mit abgelesen wird (Zarbalis, 2000). Bei 56,8°C wurden beide PCR-Produkte etwa gleich stark amplifiziert.



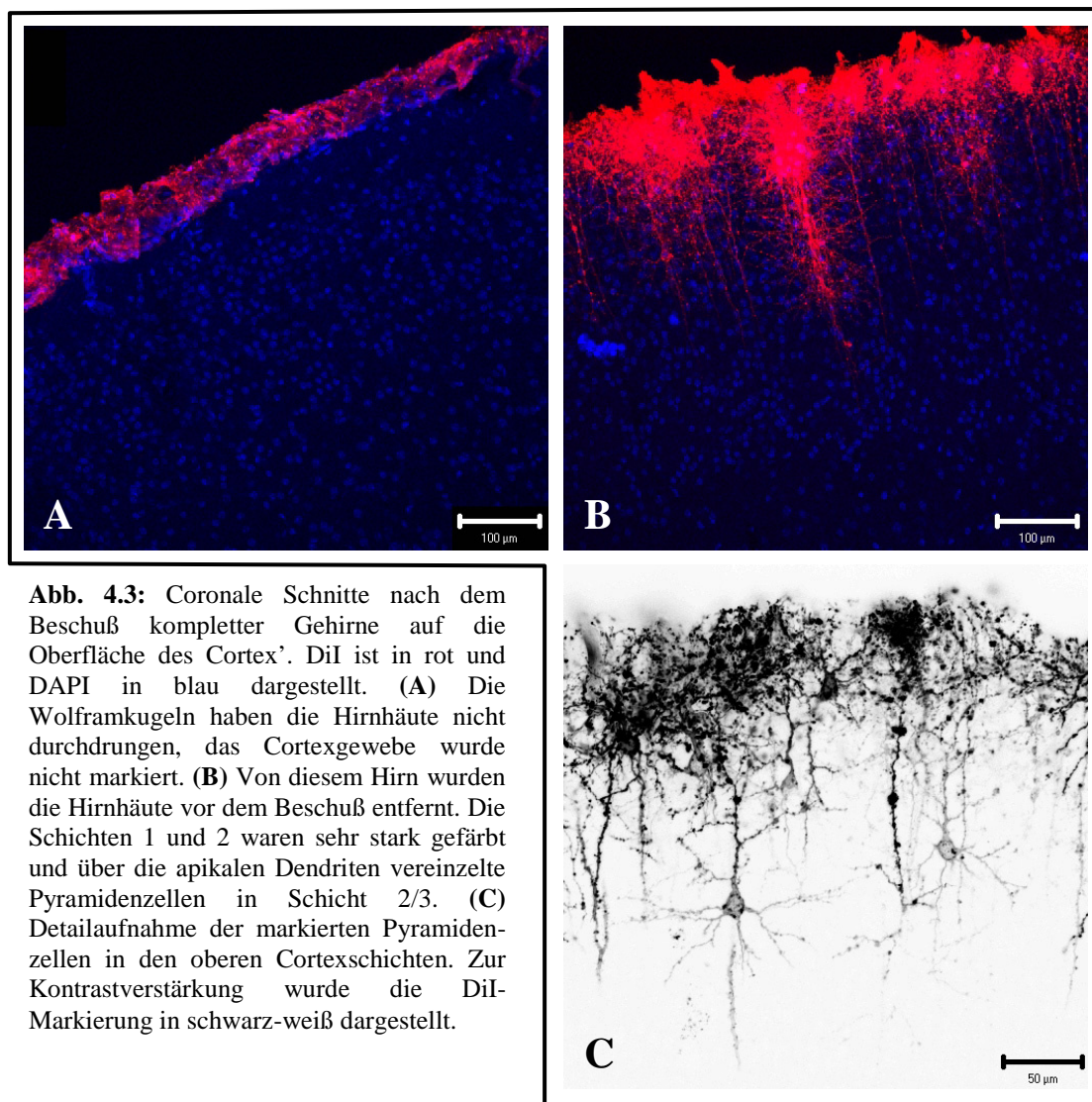
**Abb. 4.1:** Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur der Primer mit genomischer DNA von heterozygoten Mäusen. Beide Banden sind bei 56,8°C etwa gleich stark ausgeprägt.



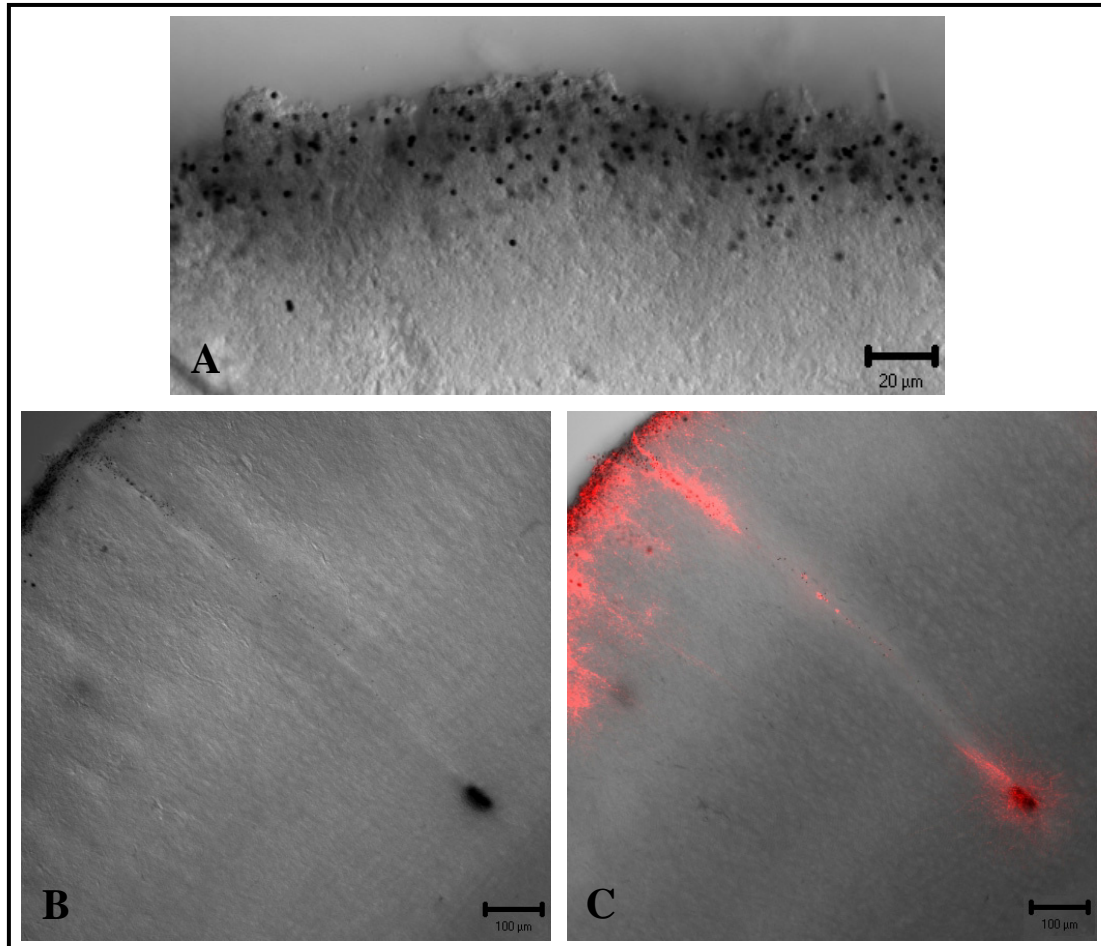
**Abb. 4.2:** Beispiel einer Genotypisierungs-PCR

## 4.2. Eindringtiefe der Wolframpartikel in perfundiertes Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden mit der *Gene-Gun* in 200µm dicken coronalen Hirnschnitten, durch den Beschuß mit farbstoffbeschichteten Wolframkugeln, Zellen markiert. Um zu bestimmen, wie tief die 1,7µm durchmessenden Partikel in perfundiertes Gewebe eindringen, wurden ungeschnittene, perfundierte Gehirne cortexseitig beschossen und anschließend 200µm dicke coronale Schnitte angefertigt. Wie in Abbildung 4.3A zu erkennen ist, durchdrangen die mit DiI beschichteten Kugeln die Hirnhäute nicht. Ausschließlich diese wurden von dem lipophilen Farbstoff angefärbt, während im Cortex keine markierten Zellen zu finden waren. Erst als die Hirnhäute entfernt wurden (Abb.4.3B und C), drangen die Kugeln in das Cortexgewebe ein.



Die genaue Messung ergab, daß die einzelnen Wolframpartikel etwa 40µm in das perfundierte Gewebe eindringen (Abb.4.4A). Die unerwünschten großen Cluster aus Kugeln und Farbstoff hingegen durchdrangen teilweise alle Schichten des Cortex (Abb.4.4B und C). Dabei wurden aber keine einzelnen Zellen angefärbt, sondern das DiI diffundierte gleichmäßig in das umliegende Gewebe.



**Abb. 4.4:** Eindringtiefe der Wolframpartikel in perfundierte Gehirne ohne Hirnhäute (A) Die Wolframkugeln dringen etwa 40µm in das Gewebe ein. (B) Große Cluster hingegen bis zu mehreren 100µm. (C) Die Überlagerung von DIC- und Fluoreszenzaufnahme zeigt, daß ausgehend von diesem Cluster das umliegende Gewebe gleichmäßig gefärbt wurde, aber keine einzelnen Zellen.

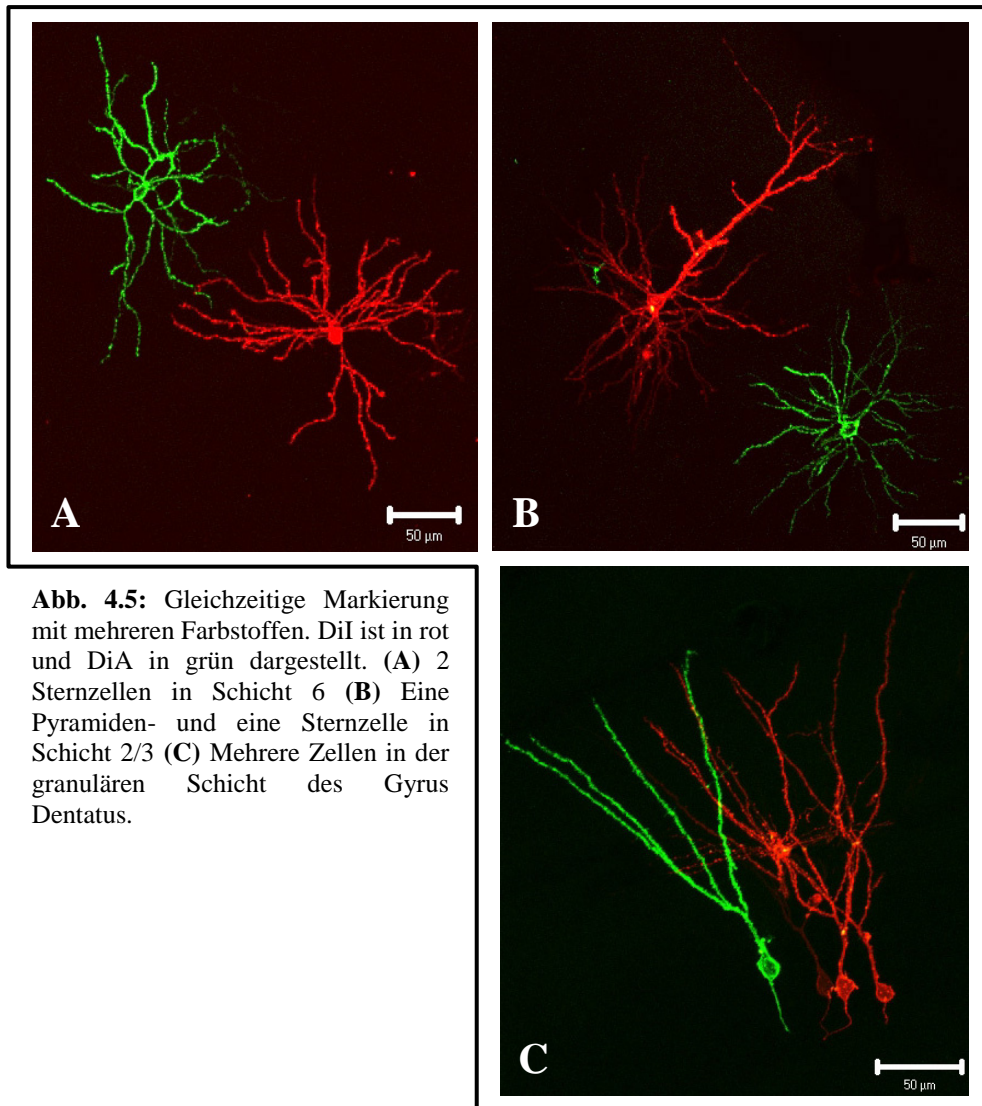
Bei dem Beschuß ganzer Hirne wurden die Schicht 1 und teilweise Schicht 2 sehr stark angefärbt. Ausgehend von den apikalen Verzweigungen in Schicht 1 diffundierte das DiI entlang der Dendriten und markierte so individuelle Schicht-2/3-Zellen. Erst nach einigen Tagen waren auch vereinzelt Zellen in Schicht 5 markiert. In dieser Zeit hatte sich das DiI allerdings auch über die gesamte Schicht 2/3 ausgebreitet, so daß dort keine individuellen Zellen mehr sichtbar waren, ebenso wie die oberen Bereiche der apikalen Dendriten der Schicht-5-Pyramidenzellen. Als die Menge der Kugeln soweit reduziert wurde, daß das DiI nicht in das umliegende Gewebe diffundierte, waren kaum Zellen markiert. Mit dem Beschuß

ganzer Hirne war es nur möglich, die Eindringtiefe der Wolframkugeln in perfundiertes Gewebe zu bestimmen. Es ist aber nicht geeignet, individuelle Zellen zu markieren. Die bessere Methode ist die, von den Hirnen coronale Schnitte anzufertigen und diese zu beschießen. Da die Kugeln 40µm ins Gewebe eindringen, werden auch tiefer im Schnitt liegende Zellen mit vollständigem Dendritenbaum markiert.

#### **4.3. Markierung mit mehreren Farbstoffen**

Wie aus dem vorherigen Abschnitt hervorgeht, darf für die Markierung nicht zuviel Farbstoff eingesetzt werden. Bei dem Beschuß von Hirnschnitten ist die Wahrscheinlichkeit größer, daß eine Kugel eine Zelle trifft, als beim Beschuß ganzer Hirne, da hier die Zellen nur über ihre apikalen Dendriten markiert werden. Damit konnte die Menge an Kugeln soweit reduziert werden, daß der Farbstoff nicht mehr in das umgebende Gewebe diffundierte, sondern nur einzelne Zellen markiert wurden. Um aber die Ausbeute an einzeln markierten Zellen noch zu erhöhen, können gleichzeitig zwei verschiedene Farbstoffe eingesetzt werden. Für die gleichzeitige Markierung mit mehreren Farbstoffen wurden, wie unter 3.3.2. beschrieben, die Patronen zu gleichen Teilen mit DiI sowie DiA beschichteten Wolframpartikeln befüllt. Somit wurde die Menge der eingesetzten Kugeln verdoppelt und mehr Zellen auf dem Schnitt markiert. Diese konnten dann in unterschiedlichen Kanälen am LSM gescannt werden (Abb.4.5).

In der Markierungseffizienz beider Farbstoffe konnten keine Unterschiede festgestellt werden, die Zellen ließen sich mit beiden Farbstoffen gleich gut anfärben. Ein kleiner Vorteil besteht jedoch in der etwas besseren Auflösung im grünen Kanal (wegen der kleineren Wellenlänge) im Vergleich zum Roten. Auf der anderen Seite jedoch ist die Hintergrundfluoreszenz im grünen Kanal höher als im Roten, was allerdings nur bei schwach markierten Zellen von Bedeutung war. Abschließend läßt sich sagen, daß die Markierung mit mehreren Farbstoffen die Ausbeute an markierten Zellen erhöht, ohne die negativen Auswirkungen, wenn nur ein Farbstoff in größerer Menge eingesetzt wird, wie zum Beispiel das Anfärben ganzer Zellcluster, in denen keine einzelnen Zellen identifiziert werden können.



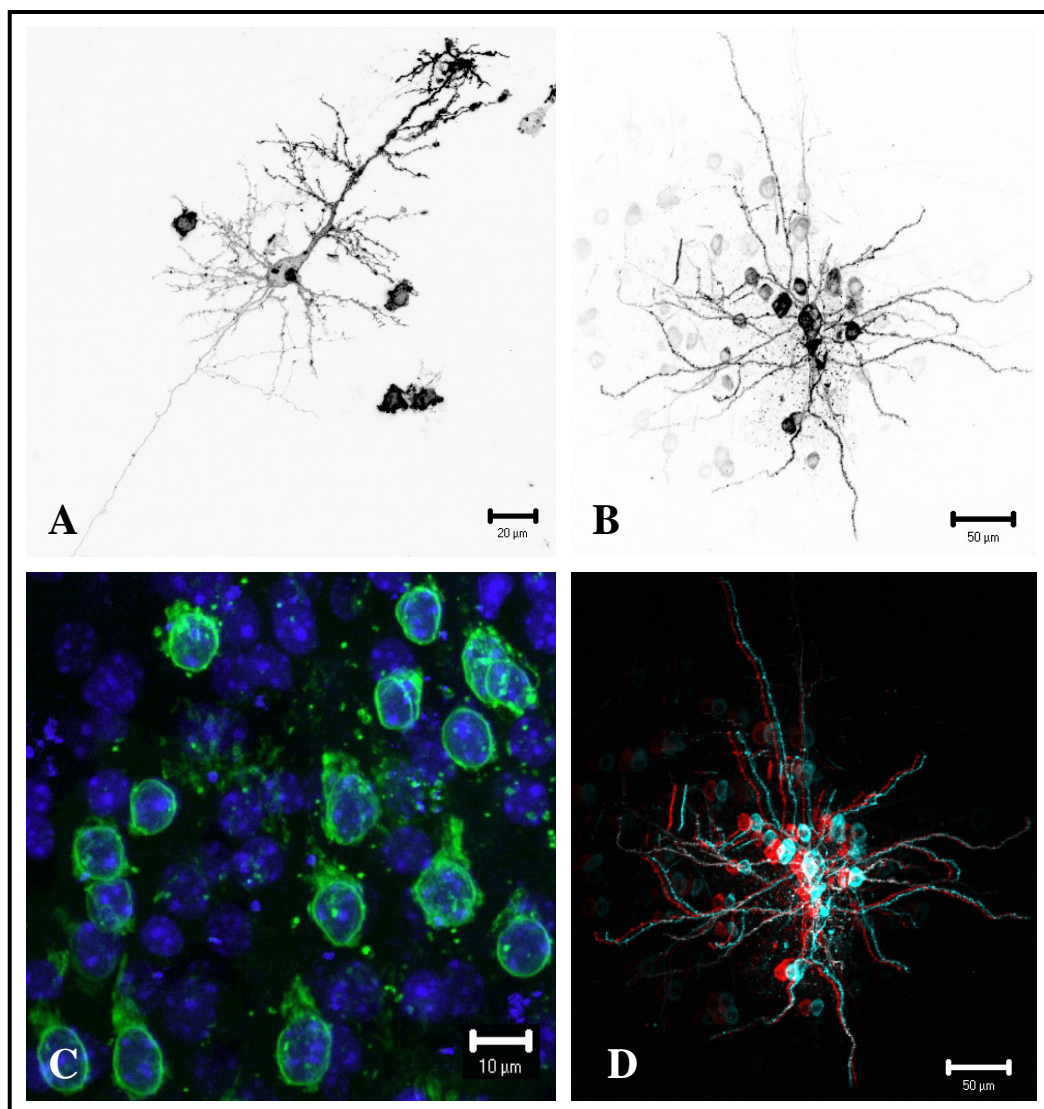
**Abb. 4.5:** Gleichzeitige Markierung mit mehreren Farbstoffen. DiI ist in rot und DiA in grün dargestellt. **(A)** 2 Sternzellen in Schicht 6 **(B)** Eine Pyramiden- und eine Sternzelle in Schicht 2/3 **(C)** Mehrere Zellen in der granulären Schicht des Gyrus Dentatus.

#### 4.4. Adendritische Zellen

Bei der Markierung von Gehirnschnitten mittels der *Gene-Gun* wurden auch Zellen markiert, welche keine Fortsätze aufwiesen. Diese Zellen kamen sowohl in frühen (P0-P8), wie auch in späten (P23) postnatalen Stadien vor. Exemplarisch aufgeführt sind P8 (Abb.4.6 A,C) und P23 (Abb.4.6 B,D). Die Nähe zu Neuronen (Abb.4.6 A,B) und das Aussehen dieser fortsatzlosen Zellen, führte zu der Annahme, es würde sich um *dyecoupling* handeln (Peinado et al., 1993a). Allerdings zeigt die Stereoprojektion der Sternzelle (Abb.4.6 D), daß diese fortsatzlosen Zellen sich nicht in der gleichen Ebene, wie die Sternzelle befanden. Diese Zellen wurden also nicht durch Dyecoupling von der Sternzelle aus markiert, sondern wurden



selber von farbstoffbeschichteten Kugeln getroffen. Das zeigt auch Abb. 4.6 C, in der diese Zellen markiert waren, ohne daß sich ein markiertes Neuron in der Nähe befand. Da diese Zellen auch in den späten postnatalen Stadien in so großer Zahl vorkommen, können es keine Neuroblasten sein. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Zellen um Mikroglia. Diese morphologisch sehr vielfältigen Zellen machen im Mauscortex 5-20% aller Zellen aus (Squire et al., 2003).



**Abb. 4.6:** Beispiele adendritischer Zellen im Cortex bei P8 (**A, C**) und P23 (**B, D**). (**A und B**) zeigt diese Zellen in der Nähe von markierten Neuronen, was den Anschein erweckt, es würde sich um Dyecoupling handeln. In der Stereoprojektion (**D**) ist zu sehen, daß die Zellen nicht in der gleichen Ebene wie das Neuron liegen. (**C**) Die Detailaufnahme zeigt, daß manche dieser Zellen völlig rund sind und andere einen kleinen Fortsatz ausbilden. DiA ist in grün und DAPI in blau dargestellt.

## **4.5. Markierung von lebendem Gewebe**

Weiterhin wurde getestet, wie gut sich lebendes Gewebe mit der *Gene-Gun* markieren läßt und ob es durch den Beschuß mit den Wolframkugeln stark beschädigt wird. Es wurden die Auswirkungen auf embryonales sowie postnatales Gewebe untersucht.

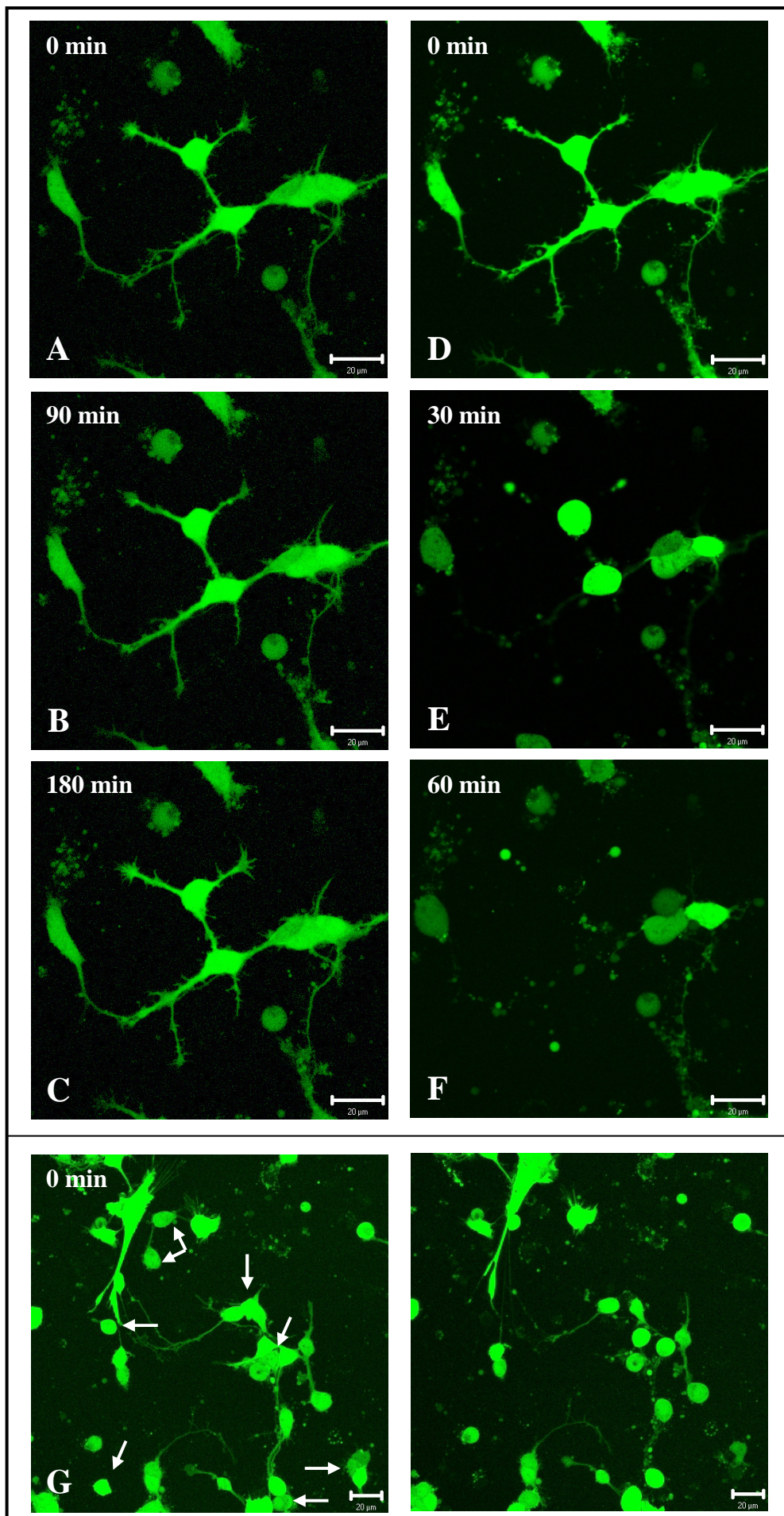
### **4.5.1. *Time-lapse*-Mikroskopie von embryonalen Zellen**

#### ***Einzelzellen***

Um zu testen, wie empfindlich embryonale Zellen auf die verschiedenen Laser des Laser-Scanning-Mikroskops reagieren, wurden EGFP-exprimierende Cortexzellen aus 14 Tage alten Embryonen präpariert, vereinzelt und auf beschichteten Deckgläsern einen Tag kultiviert. Anschließend erfolgte die *time-lapse*-Mikroskopie am LSM in einer Inkubationseinheit mit 5% CO<sub>2</sub> und 37°C. Verglichen wurde der 2-Photonen-Laser „Mai-Tai“ mit dem Argonlaser. Bei beiden Lasern war die Leistung so gering wie möglich eingestellt, unter der Voraussetzung, daß die Zellen aber noch gut detektiert werden konnten. Es wurde über verschiedene Zeiträume alle 3min gescannt.

Wie in Abbildung 4.7 zu erkennen ist, kam es beim Scannen mit dem 2-Photonen-Laser auch nach 180min zu keiner sichtbaren Beeinträchtigung der Zellen (A-C). Nach einer Erholungszeit von einer Stunde wurde der Scan mit dem Argonlaser fortgesetzt (D-F). Hier kam es sehr schnell zu einer Schädigung der Zellen. Die Zellfortsätze wurden zurückgezogen, die Zellen rundeten sich ab und platzten schließlich. Außerdem wurde noch ein anderer Bereich des Deckglases, anstatt mit dem 40er mit dem 20er Objektiv gescannt (G,H). Auch da kam es nach einer Stunde, bei einem Scanintervall von 3min zu Zellschädigungen. Der Vergleich zeigt allerdings auch, daß neben der besseren Verträglichkeit des „Mai-Tai“-Lasers, dieser gegenüber dem Argonlaser eine etwas schlechtere Auflösung hat, da die Wellenlänge des „Mai-Tai“-Lasers mit 780nm deutlich größer ist, als die des Argonlasers mit 488nm.



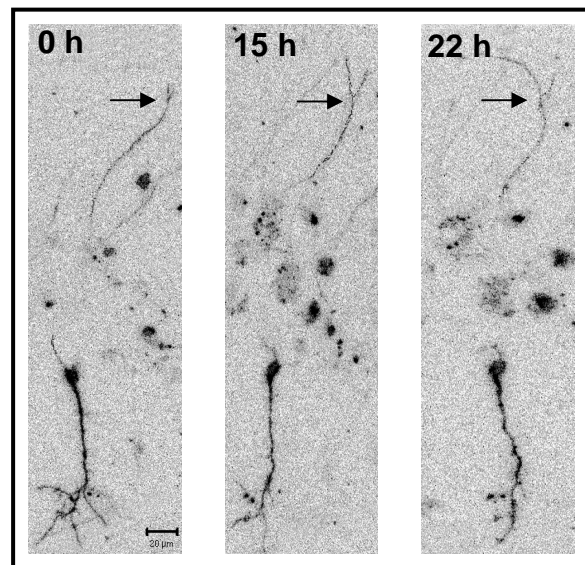


**Abb. 4.7:** „Time-lapse“-Mikroskopie von EGFP-exprimierenden Cortezzellen (E14). (A-C) Gescannt wurde alle 3min mit dem 2-Photonen-Laser und 40er Objektiv. Es gab keine sichtbare Beeinträchtigung der Zellen. (D-F) Der Scan mit dem Argonlaser führte schon nach 60min zum Absterben von Zellen. Gescannt wurde ebenfalls alle 3min mit dem 40er Objektiv. (G,H) Auch mit dem 20er Objektiv führt der Scan alle 3min mit dem Argonlaser zum Absterben von Zellen.

### Gehirnschnitte

Als nächstes wurde überprüft, wie gut sich Zellen in embryonalen Hirnschnitten mit der *Gene-Gun* markieren und anschließend mit dem LSM scannen ließen. Dazu wurden die Hirnschnitte, wie unter 3.3.3. und 3.3.4. beschrieben, präpariert.

Wie schon unter 4.3. beschrieben, gab es auch hier keine Unterschiede in der Markierungseffizienz beider Farbstoffe. Während im fixierten Gewebe, der Farbstoff nur passiv entlang der Membran diffundiert, wird er in lebenden Zellen aktiv transportiert, so daß die Zellen schon nach wenigen Stunden gescannt werden können. Zellkörper und die Dendriten waren sehr gut gefärbt, mit Ausnahme der, in diesem Experiment zu beobachtenden, Axone. Diese waren aufgrund ihres geringen Durchmessers sehr schwach markiert (Abb.4.8), was zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führte. Um die markierten Axone deutlich von der Hintergrundfluoreszenz hervorzuheben mußte die Laserleistung (im Vergleich zum vorherigen Kapitel) deutlich erhöht werden. Als Ausgleich, damit die Zellen nicht abstarben, wurde auch das Zeitintervall zwischen den Aufnahmen erhöht. Somit ist allerdings die zeitliche Auflösung beschränkt. In diesem Fall betrug das Intervall 30min.



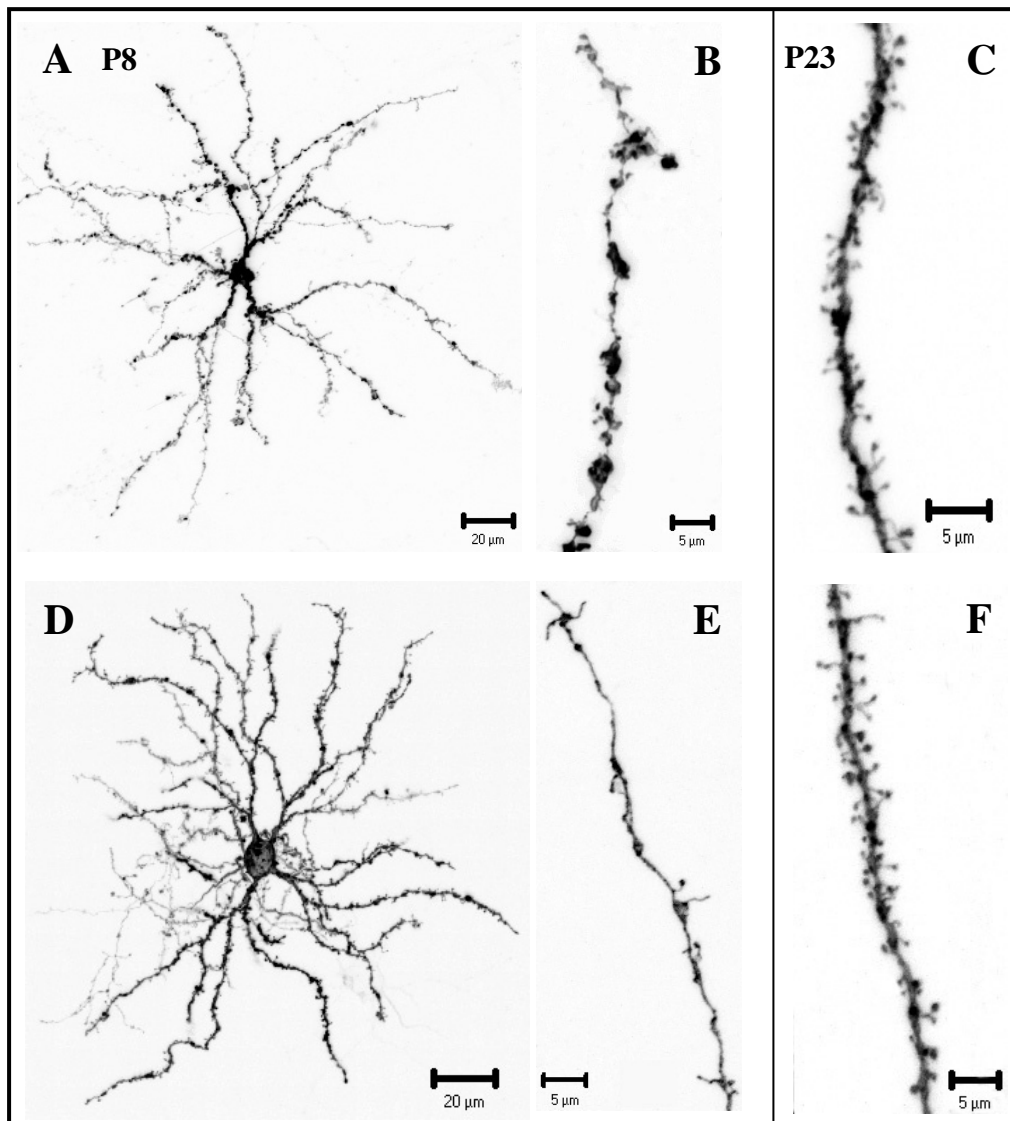
**Abb. 4.8:** Sequenz einer mit DiI gefärbten corticalen Zelle (E17), deren Axon eine Bifurkation ausbildet.

#### 4.5.2. Markierung von postnatalen Zellen

Wie unter 3.3.3. und 3.3.4. beschrieben, wurde lebendes postnatales Gewebe (P0-P8 und P23) mit verschiedenen Methoden präpariert, anschließend sofort beschossen und entweder gleich oder nach der 5 bis 20 minütigen Inkubation in HBSS/Glc bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, in PFA fixiert. Egal welche Methode angewendet wurde, ob zum Beispiel das frisch präparierte Gehirn in Agarose eingebettet, am Vibratom geschnitten, die Schnitte nach dem Beschuß mit der *Gene-Gun* 20min inkubiert und anschließend fixiert wurden, was vom Dekapitieren der Maus bis zum Fixieren etwa 40min dauerte oder aber die Schnitte mit dem *brain-slicer* angefertigt und nach dem Beschuß gleich fixiert wurden, was insgesamt etwa 6min dauerte, das Ergebnis war immer, daß die Zellen in den frühen postnatalen Stadien (P0-P8) deutliche Degenerationserscheinungen aufwiesen (Abb. 4.9). An den Dendriten dieser Zellen gab es zahlreiche lokale Verdickungen. In den späten postnatalen Stadien (P23) zeigten die Dendriten keine Degenerationen, wenn die frisch beschossenen Schnitte gleich fixiert wurden. Aber auch bei diesen Zellen gab es erste Degenerationen, wenn die Schnitte nach dem Beschuß noch in HBSS/Glc bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

Wenn das Gewebe durch die Perfusion schon anfixiert war, gab es sowohl in frühen, wie auch in späten postnatalen Stadien keine Degenerationen der Dendriten.

Das zeigt, daß die jungen Zellen sehr empfindlich auf Veränderungen des Milieus reagieren. Schon nach ein paar Minuten verändert sich die Morphologie der Dendriten. Anders reagieren die Dendriten der reiferen Zellen. Bei ihnen dauert es länger bis sie sich verändern. Um jegliche Veränderungen an den Zellen zu vermeiden, muß das Gewebe durch Perfusion schon anfixiert sein.



**Abb. 4.9:** Vergleich der Markierung von lebenden (**A-C**) und perfundierten (**D-F**) postnatalen Gewebe.

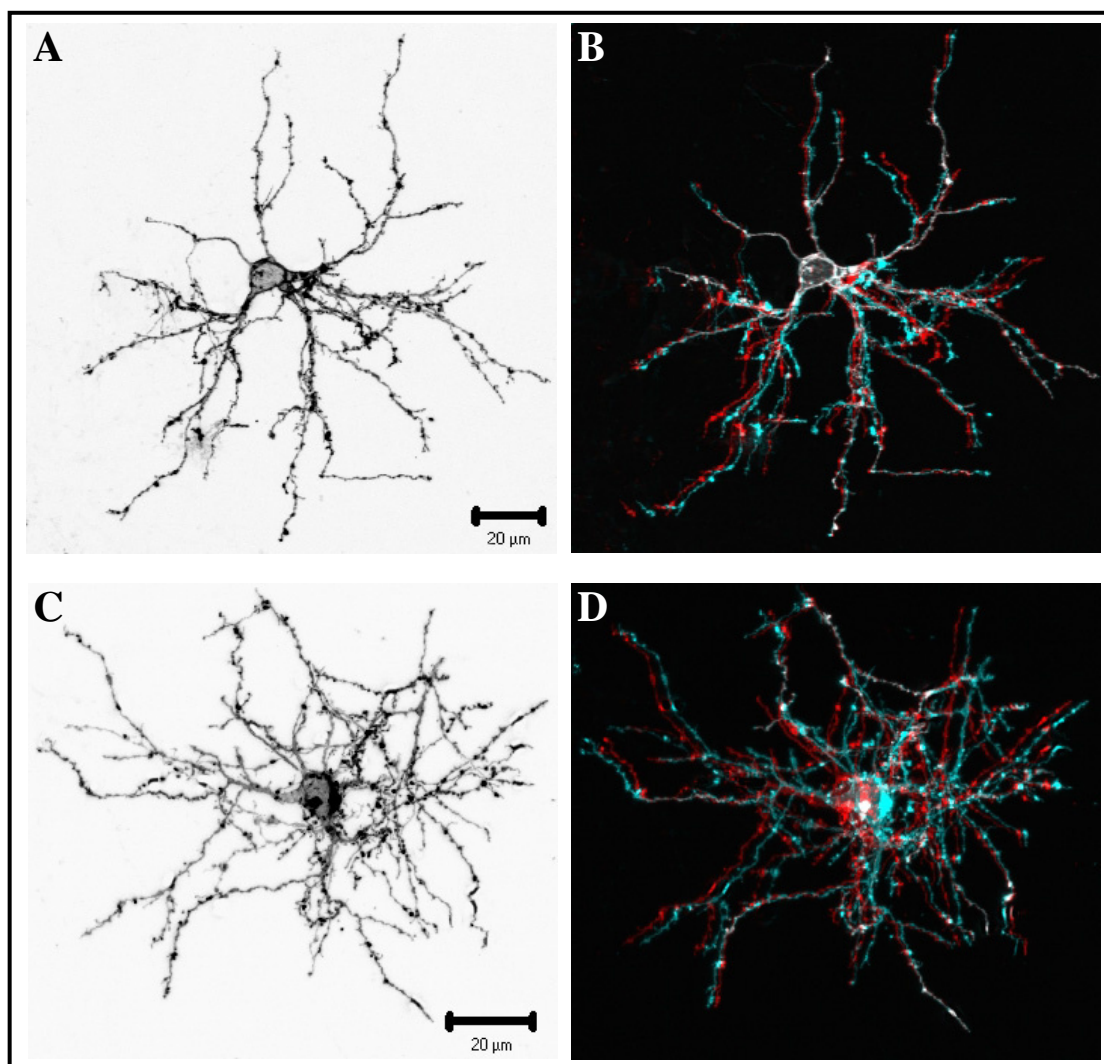
(**A**) Die lebend markierte Sternzelle (P8) weist deutliche Degenerationserscheinungen auf, welche sich im Detail als zahlreiche Verdickungen des Dendriten zeigen (**B**). Im Gegensatz dazu, treten diese Degenerationen an den Dendriten lebender Zellen in späten postnatalen Stadien (P23) nicht auf (**C**), ebenso wie im perfundierten Gewebe (**D-F**).



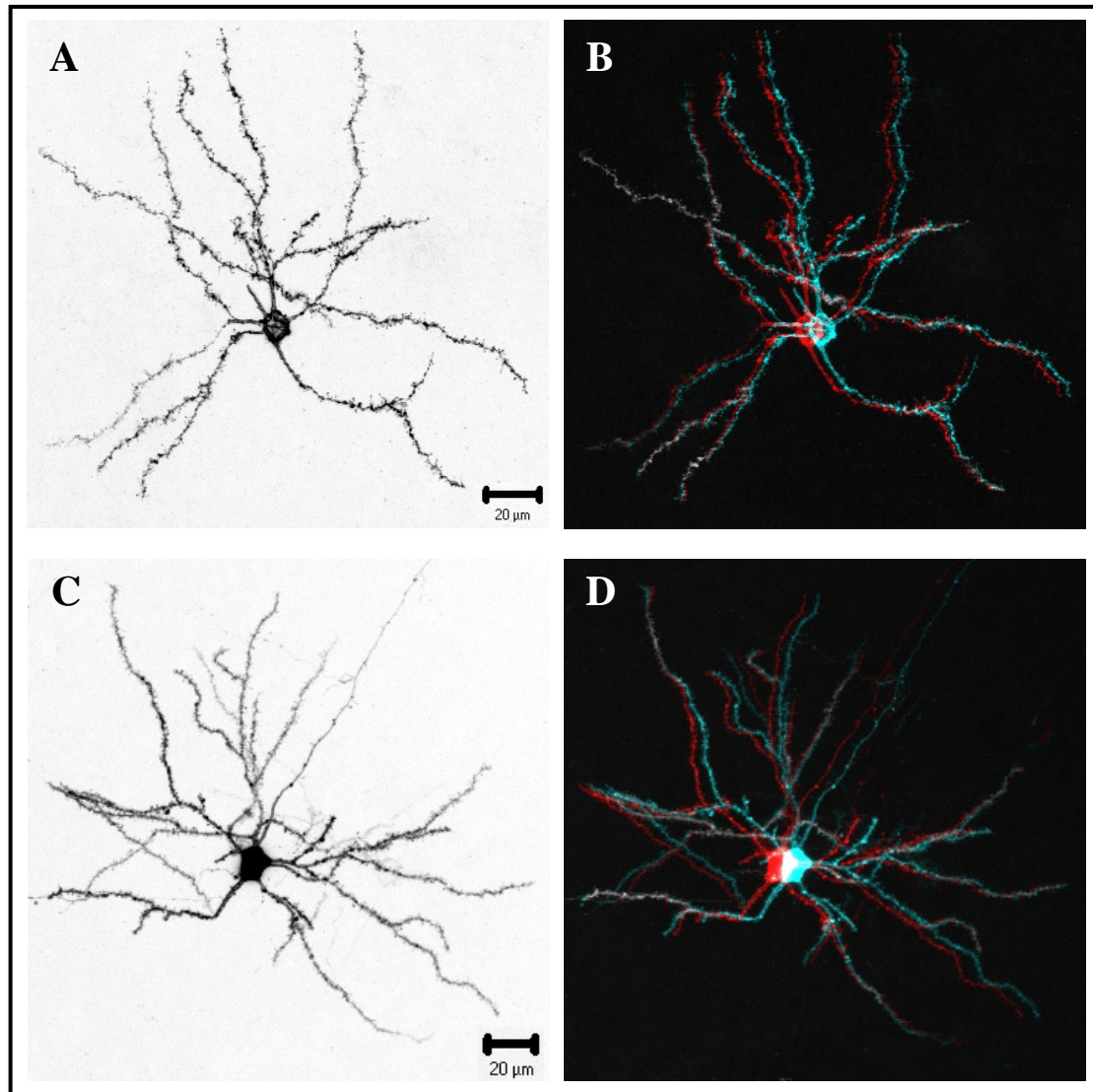
#### **4.6. Vergleich der Schicht-4-Sternzellen von *ephrinA5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen**

Für die morphologischen Untersuchungen wurden 43 Zellen verwendet, die gut mit Farbstoff markiert waren und detaillierte Analysen erlaubten. Davon waren 22 Zellen aus Wildtyp-Mäusen und 21 Zellen aus Knockout-Mäusen.

In Bezug auf die Somagröße und den Radius des Dendritenbaums gibt es kaum Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp (Abb. 4.10 und 4.11). Zu keinem untersuchten Zeitpunkt gibt es einen signifikanten Unterschied in Umfang und Fläche der Somata. Der Umfang aller Somata liegt bei etwa  $38\mu\text{m}$  und die Fläche bei etwa  $100\mu\text{m}^2$  (Abb.4.12).

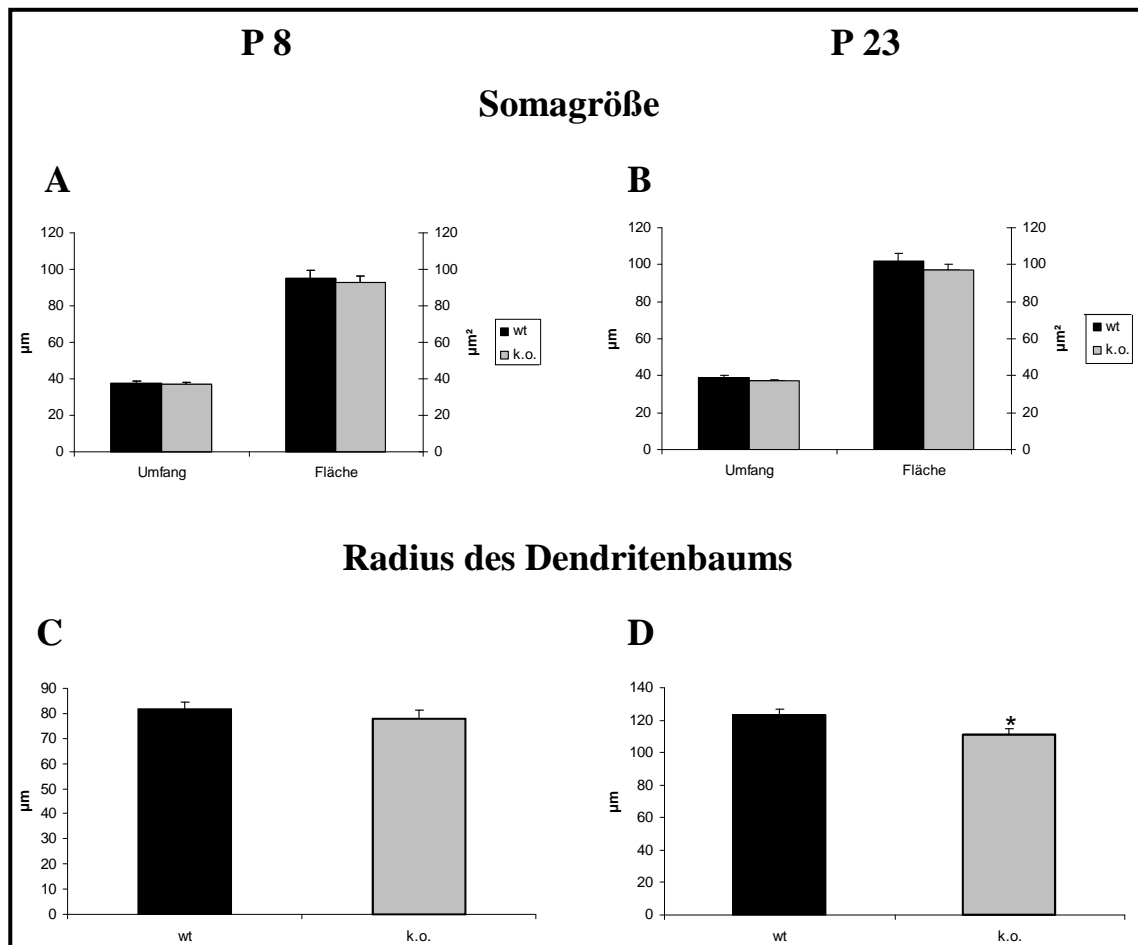


**Abb. 4.10:** Charakteristische Beispiele von Schicht-4-Sternzellen im frühen Stadium der Entwicklung (P8). Zwischen den Zellen des Wildtyps (**A, B**) und der Mutante (**C, D**) gibt es keine erkennbaren Unterschiede in der Größe ihrer Somata und der Radien ihrer Dendritenbäume. Allerdings sind die Dendriten der Mutante stärker verzweigt, als die des Wildtyps.



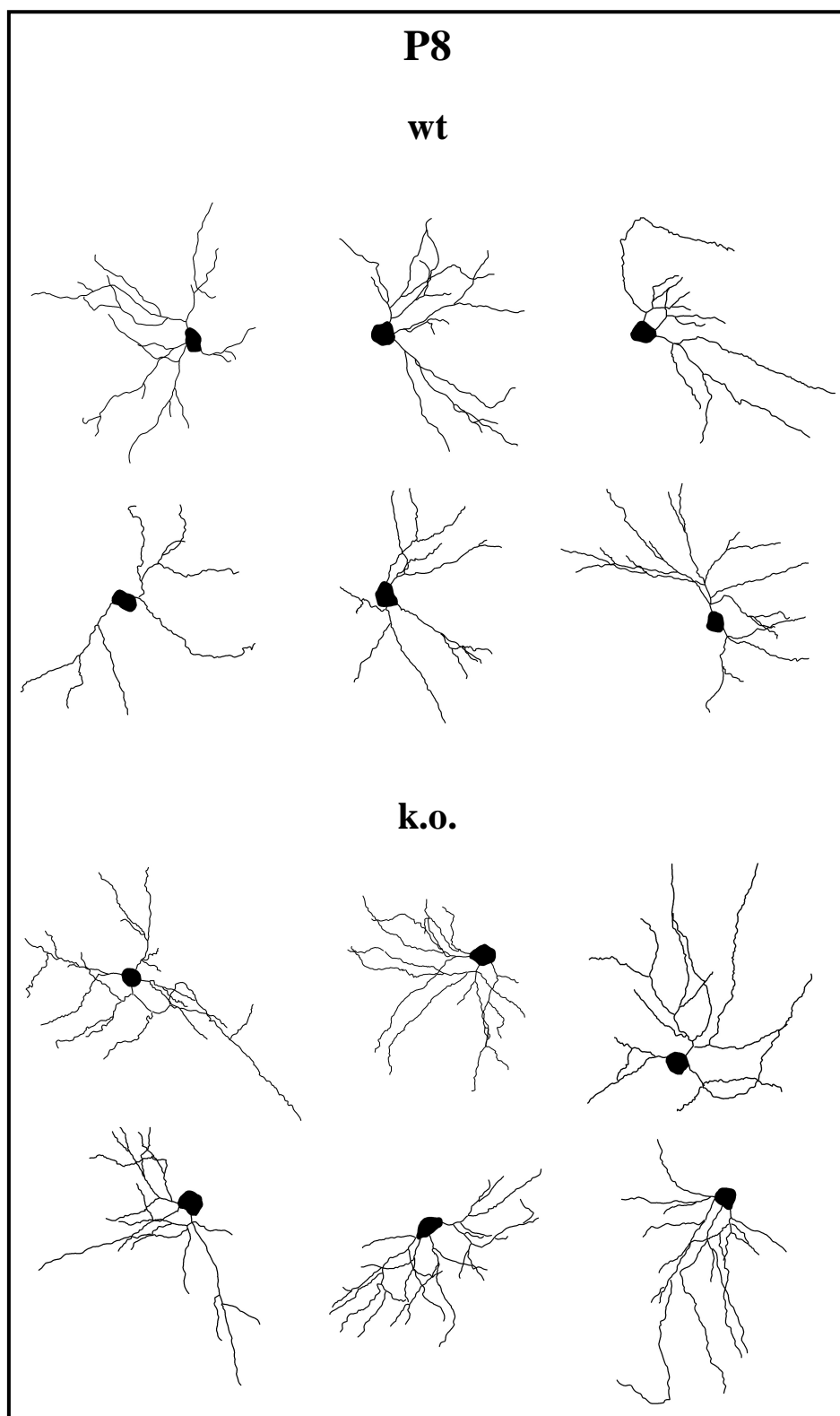
**Abb. 4.11:** Charakteristische Beispiele von Schicht-4-Sternzellen im späten Stadium der Entwicklung (P23). Auch bei dieser Altersstufe gibt es zwischen den Zellen des Wildtyps (**A, B**) und der Mutante (**C, D**) keine erkennbaren Unterschiede in der Größe ihrer Somata und der Radien ihrer Dendritenbäume. Die Dendriten der Mutante sind immer noch stärker verzweigt, als die des Wildtyps.

Ebenso ist der Radius des Dendritenbaums (die jeweils drei längsten Dendriten der Zellen wurden gemessen) bei P8 nicht signifikant verschieden. Die Dendriten beider Zelltypen sind etwa 80µm lang. Allerdings ist dieser Radius später (P23) bei den Zellen der Mutante etwas kleiner (111µm), als bei denen des Wildtyps (123µm) (Abb.4.12).



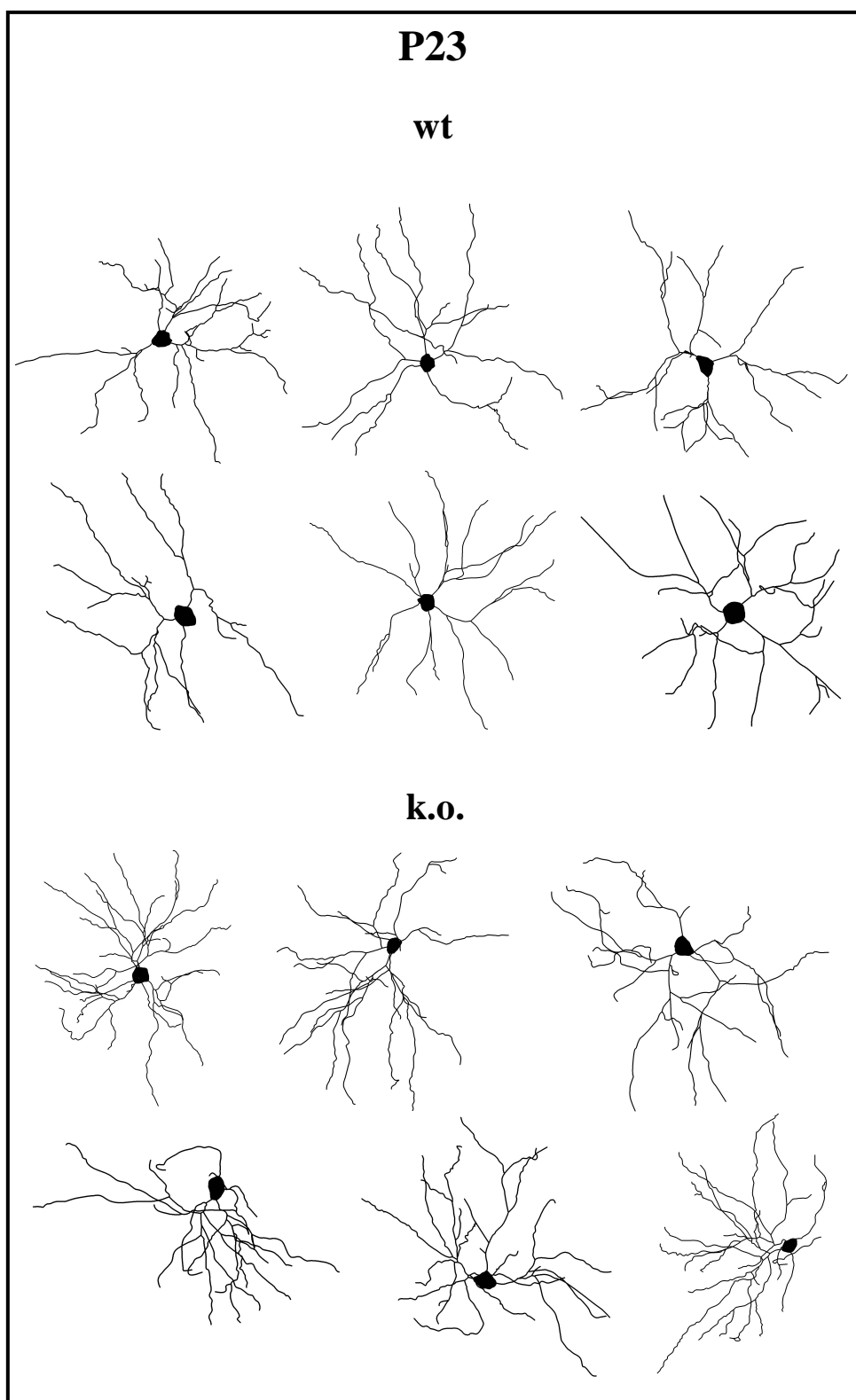
**Abb. 4.12:** Quantitative Analyse der Somagröße und des Dendritenbaumradius'. Für die Bestimmung des Radius' wurden die drei längsten Dendriten pro Zelle vermessen. (A, B) In Bezug auf Umfang und Fläche des Somas gibt es zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante. Während im frühen postnatalen Stadium der Radius des Dendritenbaums von Wildtyp und Mutante gleich ist (C), sind im späten postnatalen Stadium die mutierten Zellen geringfügig kleiner als die Wildtyp-Zellen (D).

Während es also in der Zellgröße kaum Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante gibt, verzweigen sich allerdings die Dendriten in der Knockout-Maus stärker als die Dendriten des Wildtyps (Abb. 4.13 und 4.14). Im frühen postnatalen Stadium (P8) bilden die Zellen des Wildtyps dendritische Verzweigungen bis zur 5. Ordnung aus und die Zellen der Mutante bis zur 7. Ordnung. Später in der Entwicklung (P23), nachdem die Dendriten noch gewachsen sind, verzweigen sich die Dendriten im Wildtyp bis zur 8. Ordnung und die der Mutante bis zur 10. Ordnung (Abb.4.15).

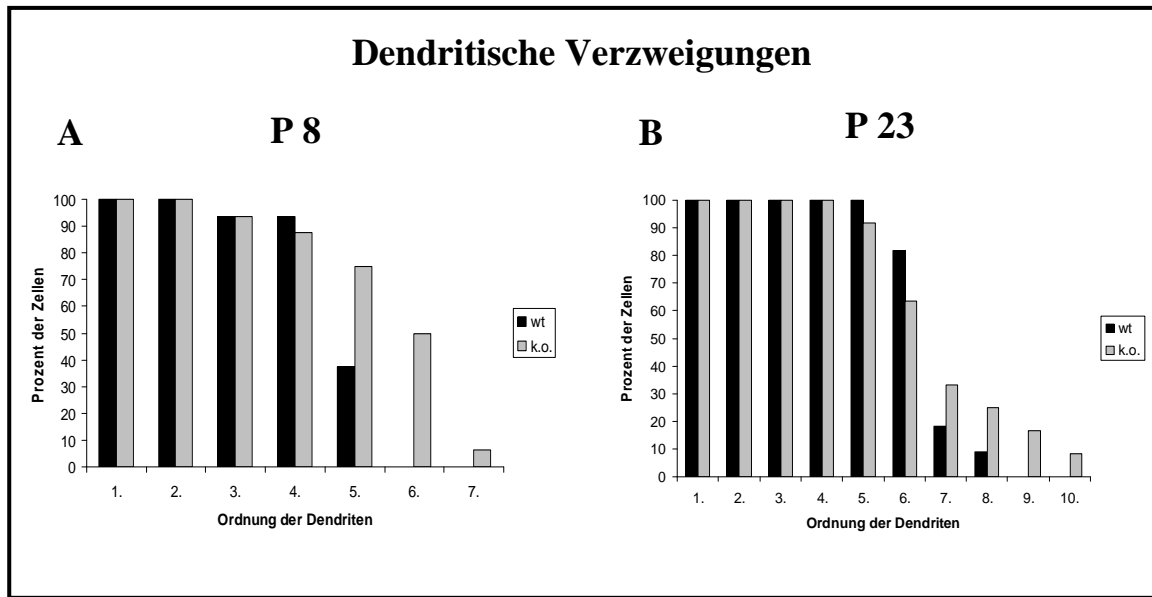


**Abb. 4.13:** Morphologie der Dendriten von Schicht-4-Sternzellen im jungen postnatalen Stadium (P8). Die Dendriten der mutierten Zellen sind stärker verzweigt und mäandern mehr beim Wachstum, als die der Wildtyp-Zellen.





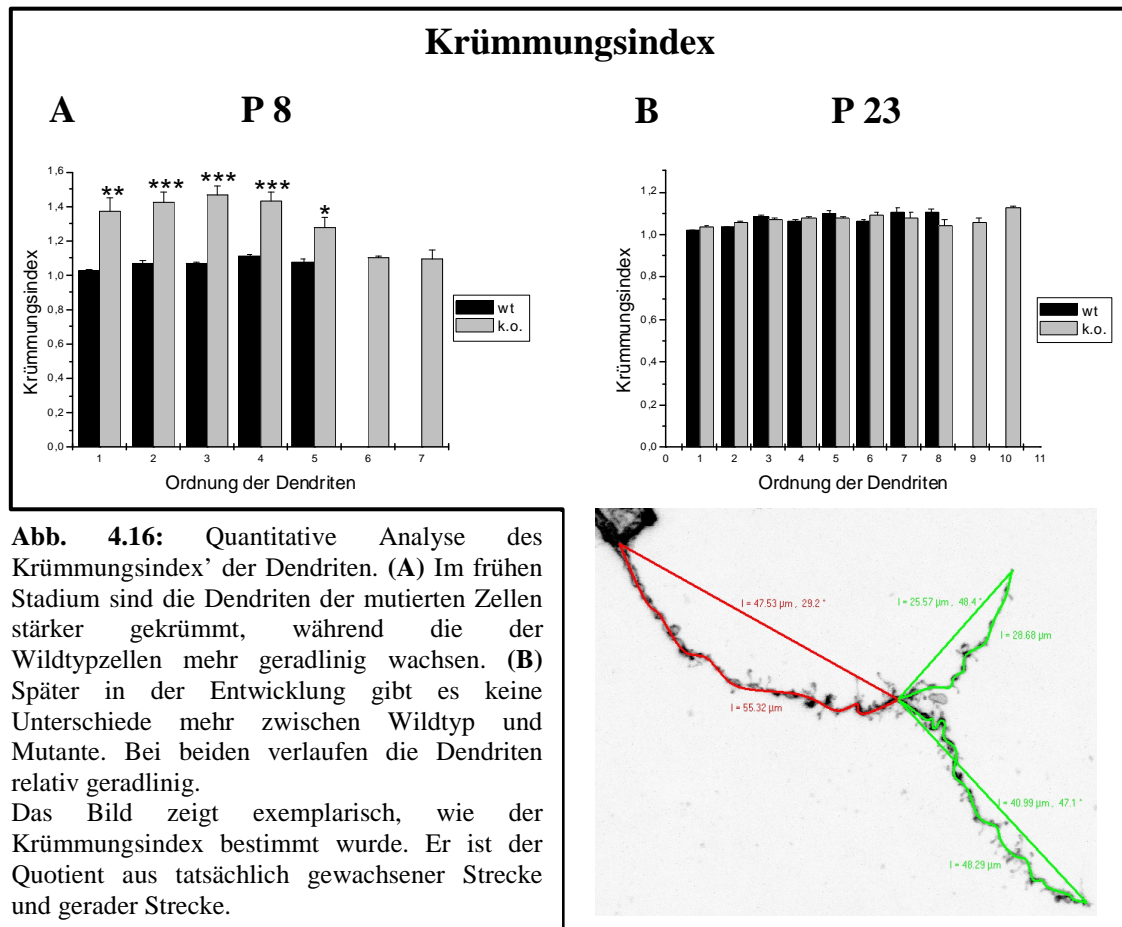
**Abb. 4.14:** Morphologie der Dendriten von Schicht-4-Sternzellen im späten postnatalen Stadium (P23). Die Dendriten der mutierten Zellen sind stärker verzweigt als die der Wildtyp-Zellen, sind aber nicht mehr stärker gekrümmt.



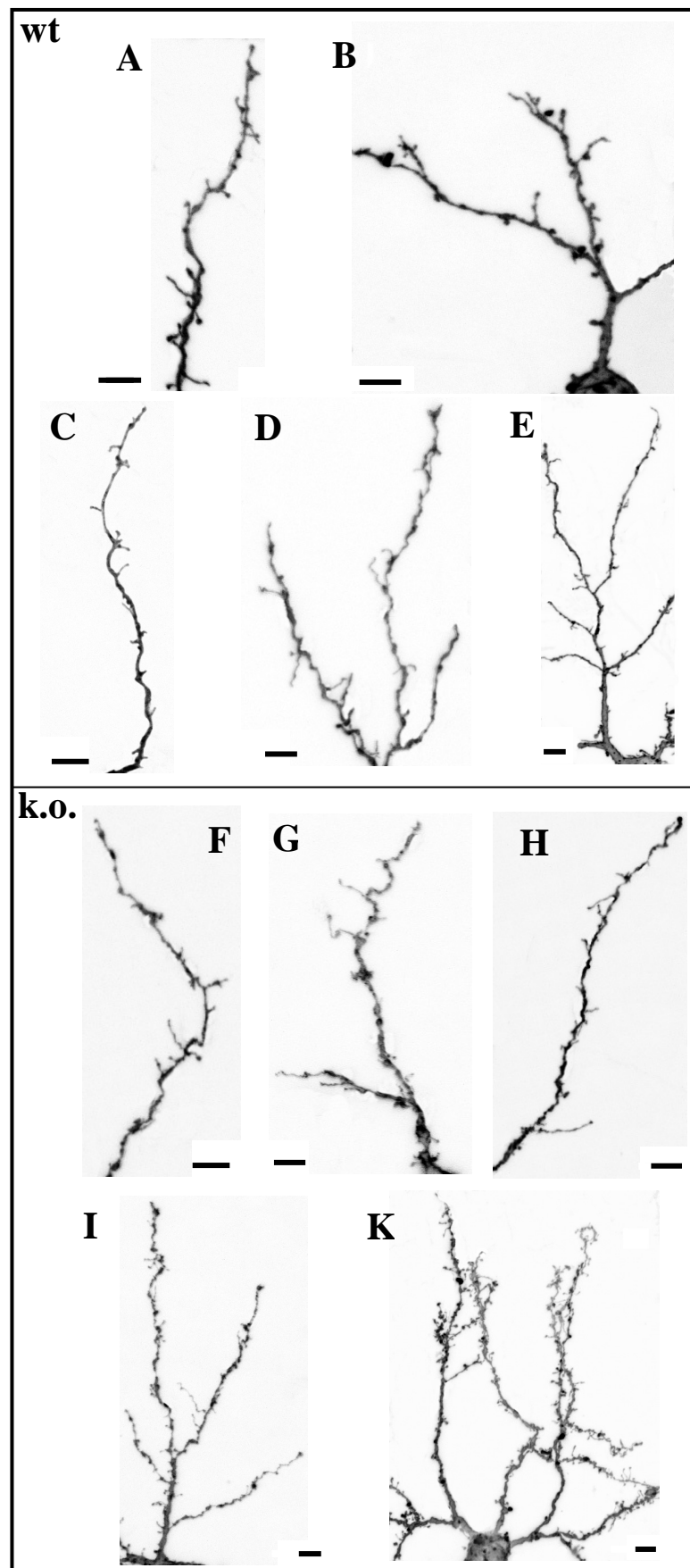
**Abb. 4.15:** Quantifizierung der Verzweigungsmuster. (A) Während sich die Dendriten im frühen postnatalen Stadium beim Wildtyp nur bis maximal zur 5. Ordnung verzweigen, weisen die Mutanten Verzweigungen bis zur 7. Ordnung auf. (B) Im späten Stadium sind die Dendriten bei der Mutante ebenfalls stärker verzweigt (bis zur 10. Ordnung) als beim Wildtyp (max. 8. Ordnung).

Des Weiteren weisen die Dendriten der mutierten Zellen im frühen postnatalen Stadium einen größeren Krümmungsindex auf, als die der Wildtyp-Zellen. Der Krümmungsindex eines Dendritenabschnitts ist der Quotient von tatsächlich gewachsener Strecke des Dendriten und der geraden Strecke zwischen Anfang und Ende des gemessenen Abschnitts (Abb. 4.16). Die Dendriten der Mutante zeigen oft ein mäanderndes Wachstum (Abb. 4.17 F und G), was im Wildtyp kaum zu beobachten ist. Im späteren Stadium gibt es keinen Unterschied mehr zwischen Wildtyp und Mutante, die Dendriten sind relativ geradlinig. Das läßt vermuten, daß sich die Dendriten im Lauf der Entwicklung glätten und somit ihre Länge verkürzen. Das würde auch erklären, warum die mutierten Zellen bei P23 einen etwas kleineren Radius aufweisen als die Wildtyp-Zellen. Somit ist der tatsächliche Radius der Fläche (bei P8 muß der durchschnittliche Krümmungsindex herausgerechnet werden), welche vom Dendriten bedeckt wird, bei der Mutante kleiner als beim Wildtyp. Allerdings ist durch die stärkere Verzweigung der Dendriten in der Mutante die Bedeckung dichter. Es könnte sein, daß der Wachstumskegel des Dendriten die schon zurückgelegte Strecke mißt, so daß die Dendriten im Wildtyp und der Mutante die gleiche Länge haben und da sie bei der Mutante stärker gekrümmt sind, eine kleinere Fläche bedecken. Dafür würde auch die Beobachtung sprechen, daß sowohl im Wildtyp, wie auch in der Mutante, in beiden untersuchten Stadien an der

selben Zelle wenig verzweigte Dendriten (z.B. bis zur 2. Ordnung) genauso lang sind, wie stärker verzweigte (Abb. 4.12, bis 4.15).

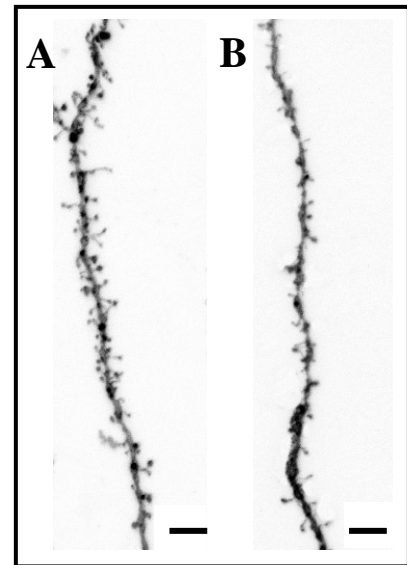


Die jungen Sternzellen der Schicht 4 bilden an ihren Dendriten zahlreiche Filopodien aus. Im Laufe der Entwicklung werden die Filopodien durch dendritische Spines ersetzt (Abb. 4.17 und 4.18). Am postnatalen Tag 8 bilden die Zellen der Mutante mehr Filopodien aus als die Zellen des Wildtyps. Die Filopodiendichte im Wildtyp liegt bei 1-1,5 Filopodien pro 10µm, in Abhängigkeit der Ordnung des Dendriten (Abb. 1.19 A). In der Mutante liegt sie zwischen 1,2 und 1,9 Filopodien pro 10µm, wobei sich die meisten Filopodien im mittleren Bereich des Dendritenbaums befinden und ihre Anzahl im proximalen und distalen Bereich abnimmt. Später in der Entwicklung (P23), wenn die meisten Filopodien durch Spines ersetzt wurden, besitzen die Zellen in der Knockout-Maus allerdings weniger Spines und damit auch weniger Synapsen als die Zellen des Wildtyps (Abb.4.18).

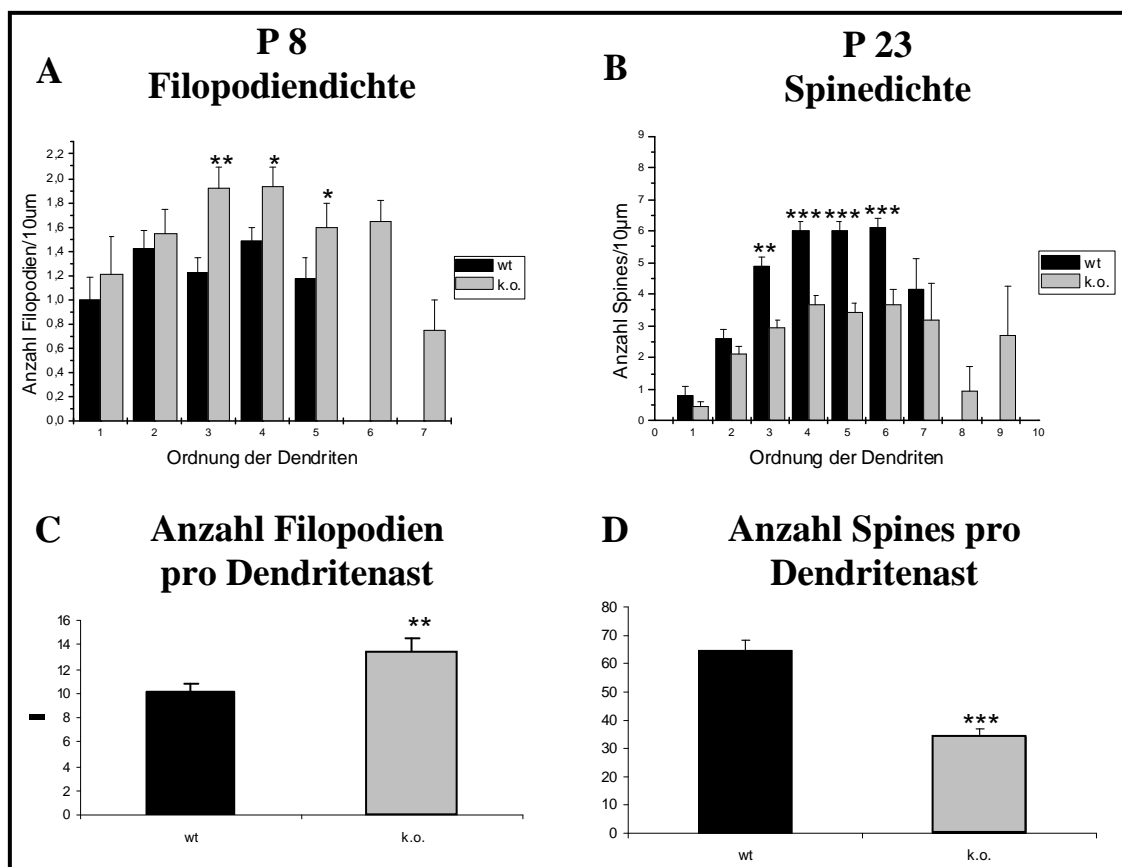


**Abb. 4.17:** Charakteristische hochauflösende Aufnahmen der Dendriten im frühen postnatalen Stadium (P8). Maßstab: 5μm

Die höchste Spinedichte wird im mittleren Bereich des Dendritenbaums erreicht, bei der Mutante etwa 3,5 Spines pro 10µm und beim Wildtyp etwa 6 Spines pro 10µm (Abb.4.19 B). Obwohl die Dendriten in der Mutante stärker verzweigt sind, sinkt die absolute Anzahl der Spines pro Dendritenast (die 3 längsten Dendriten wurden vermessen) in der Mutante auf die Hälfte des Wertes vom Wildtyp. Während ein Dendritenast im Durchschnitt beim Wildtyp 65 Spines besitzt, weist er in der Mutante nur 34 Spines auf (Abb.4.19 D).

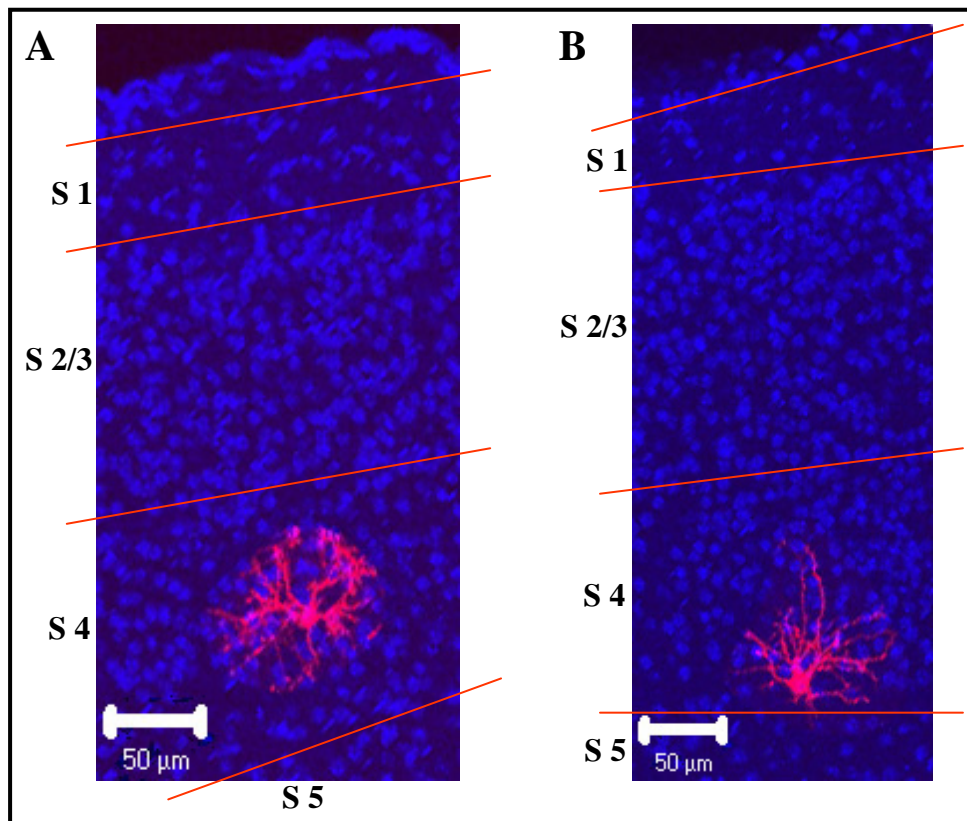


**Abb. 4.18:** Charakteristische Beispiele der Spinedichte von (A) Wildtyp-Zellen und (B) mutierten Zellen während der späten Entwicklungsphase (P23). Maßstab: 5µm



**Abb. 4.19:** Quantitative Analyse der Filopodiendichte (P8) und Spinedichte (P23). (A, C) Im Vergleich zum Wildtyp bilden die Knockout-Zellen mehr Filopodien aus. (B, D) Später in der Entwicklung weisen die Dendriten der Knockout-Zellen allerdings weniger Spines auf, als die der Wildtyp-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die jungen Sternzellen der Schicht 4 in der *ephrinA5*-Knockout-Maus vermehrt Filopodien ausbilden und die Dendriten stärker verzweigen. Später in der Entwicklung sind die Zellen immer noch stärker verzweigt, die Spinedichte auf den Dendriten ist aber reduziert. Die absolute Anzahl der Spines pro Dendritenast zeigt, daß die Anzahl der reifen Synapsen, trotz stärkerer Verzweigung der Dendriten, auf die Hälfte des Wertes vom Wildtyp sinkt. Auf den Radius des Dendritenbaums hat das Fehlen von *ephrinA5* hat zunächst keinen Einfluß. Die Dendriten legen beim Wachstum die gleiche Strecke zurück, allerdings mäandern sie stärker in der Mutante. Da sich die Dendriten später aber glätten, sind die mutierten Zellen etwas kleiner. Vom Knockout unbeeinflusst, bleibt ebenfalls die Schichtspezifität der Zellen. Abb. 4.20 zeigt exemplarisch, daß die Zellen an der Grenze von Schicht 4 ein asymmetrisches dendritisches Feld haben, während die Zellen die mittig in der Schicht 4 liegen, ein radiärsymmetrischen Dendritenbaum besitzen.



**Abb. 4.20:** Lage der Zellen im Cortex. Dargestellt sind nur Beispiele von mutierten Zellen. Von Wildtyp-Zellen wurden aber ähnliche Beispiele gefunden. (A) Die Zelle mitten in der Schicht 4 hat ein annähernd symmetrisches dendritisches Feld. (B) Die Zelle an der unteren Grenze der Schicht 4 hat ein asymmetrisches dendritisches Feld.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des Fehlens von *ephrinA5* und der damit einhergehende reduzierte thalamische Input, auf die Zielzellen der thalamischen Afferenzen, den Sternzellen in Schicht 4 des somatosensorischen Cortex untersucht. Die Methode des *diolistic labeling* (Gan et al., 2000) wurde so verändert, daß sie für diese Untersuchungen anwendbar waren.

### 5.1. Die ballistische Markierung von Neuronen

Es gibt vielfältige Methoden um Nervenzellen im Gewebe zu markieren. Der wesentliche Vorteil des *diolistic labeling* von Zellen mit verschiedenen lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen liegt darin, daß eine große Anzahl von Zellen sehr schnell markiert werden können. Da die Wolframpartikel nur etwa 40µm in das Gewebe eindringen, führt der Beschuß ganzer Hirne auch nach der Entfernung der Hirnhäute nur dazu, daß die Schicht 1 und tiefer liegende Zellen, die apikale Dendriten in dieser Schicht ausgebildet haben, angefärbt werden. Diese Art der Markierung bietet also keinen Vorteil gegenüber der Methode, bei der DiI-Kristalle auf die Oberfläche des Gehirns aufgebracht werden. Auch hier wird die obere Schicht komplett angefärbt und der Farbstoff diffundiert entlang der apikalen Dendriten zu den Zellen in den unteren Schichten.

Um Zellen in der Schicht 4 zu markieren, muß das Gehirn coronal geschnitten und die Schnitte dann beschossen werden. Damit die Details in den Dendritenbäumen der gefärbten Zellen ausgewertet werden können, sollten diese möglichst vereinzelt stehen. Die Dichte der markierten Zellen wird dabei über die Menge der eingesetzten farbstoffbeschichteten Kugeln, dem Abstand zwischen Schnitt und *Gene-Gun* und dem Heliumdruck reguliert. Zusätzlich können auch mehrere Farbstoffe gleichzeitig eingesetzt werden um die Ausbeute an einzeln markierten Zellen zu erhöhen, da die Dichte der Zellen im jeweiligen Farbkanal, in dem sie aufgenommen werden, nicht zunimmt. Beide in dieser Arbeit eingesetzten Farbstoffe, DiI und DiA, verhielten sich hinsichtlich ihrer Markierungseffizienz ähnlich. Der Vorteil des rotfluoreszierenden DiIs ist die geringe Hintergrundfluoreszenz in diesem Spektralbereich, was allerdings nur bei schwach markierten Neuronen ins Gewicht fällt. Das DiA hat wiederum den Vorteil der etwas besseren Auflösung, durch die kleinere Wellenlänge des emittierten Lichts.

### 5.1.1. Markierung von lebendem und perfundiertem Gewebe

Die Vorteile von lebendem gegenüber perfundiertem Gewebe liegen zum Beispiel darin, daß Entwicklungsprozesse untersucht werden können oder, daß der Farbstoff nicht nur passiv in der Membran diffundiert, sondern auch aktiv in die Zellfortsätze transportiert wird und somit die gesamte Zelle schneller gefärbt ist. Dabei ist nun von entscheidender Bedeutung was untersucht werden soll. So lassen sich zwar embryonales und postnatales Gewebe gut markieren, in beiden Geweben sind die Zellen nach wenigen Minuten gefärbt. Allerdings treten bei den postnatalen Zellen schnell Degenerationen an den Dendriten auf. Neben diesen Degenerationen bilden die Neurone während der Präparation der Schnitte zusätzlich verstärkt Filopodien aus (Kirov et al., 1999; Oray et al., 2004). Um jegliche Veränderungen an den postnatalen Zellen zu vermeiden, wurden für die Untersuchung der Sternzellen ausschließlich perfundierte Gehirne verwendet.

Weiterhin muß beim Scannen von lebendem Gewebe beachtet werden, daß die Wahl des Lasers und damit der zu verwendende Farbstoff abhängig von der zu untersuchenden Struktur ist. Für die Aufnahme der sehr dünnen und damit schwach gefärbten Axone sind am besten DiI und der Helium-Neon-Laser geeignet, da im roten Spektralbereich die Hintergrundfluoreszenz am geringsten und dieser Laser der Energieärmste ist. Bei der Verwendung von DiA hat der Argonlaser aufgrund seiner kleinen Wellenlänge die beste Auflösung, aber dieser schädigt aufgrund seiner hohen Energie und der starken endogenen Absorption des blauen Anregungslichts die Zellen am meisten. Außerdem ist die Hintergrundfluoreszenz im grünen Bereich sehr hoch. Obwohl der „Mai-Tai“-Laser am besten für lebendes Gewebe geeignet ist, da das von ihm verwendete Infrarotlicht kaum vom Gewebe absorbiert wird und die 2-Photonen-Anregung nur in der Fokusebene stattfindet, gibt es einige Nachteile bei der Aufnahme von Axonen. Zum einen hat der Laser die geringste räumliche Auflösung, da die Wellenlänge mit 780nm am größten ist und zum anderen ist die Hintergrundfluoreszenz im lebenden Gewebe bei der 2-Photonen-Anregung am höchsten, da sehr viele intrinsische Fluorophore, wie z.B. aromatische Aminosäuren, NADH und Flavine, mit angeregt werden (Zipfel et al., 2003). Wenn allerdings stark gefärbte Bereiche gescannt werden, wie die Dendriten oder Zellkörper, fällt das nicht ins Gewicht und daher ist der 2-Photonen-Laser am besten geeignet. Somit ist die Methode des *diolistic labeling* sehr gut für perfundiertes Gewebe und mit einigen Einschränkungen für lebendes Gewebe geeignet.



## **5.2. Adendritische Zellen**

Bei der Auswertung der Sternzellen fielen immer wieder fortsatzlose, fast runde Zellen auf, die meist in der Nähe markierter Neurone auftraten, was vermuten ließ, daß es sich bei diesen adentrischen Zellen um andere Neurone handelte, deren Soma mittels *dyecoupling* angefärbt war. Wenn ein niedermolekularer intrazellulärer Marker, wie zum Beispiel Neurobiotin, in eine Zelle injiziert wird, werden in jungen postnatalen Schnitten bis zu 80 andere Neurone, in der Umgebung der injizierten Zelle, mit angefärbt. In der Gegenwart von Halothan, einem *gap-junction*-Blocker, unterbleibt die Ausbreitung des Farbstoffs in andere Neurone, was dafür spricht, daß die Markierung der anderen Neurone über *gap-junctions* erfolgt. Diese Kopplung zwischen den Neuronen ist temporär. Ab dem postnatalen Tag 16 ist kein *dyecoupling* mehr feststellbar (Peinado et al., 1993a). Da aber in der vorliegenden Arbeit diese Zellen auch noch später (P23) in großer Zahl vorhanden waren, scheinen es keine Neurone zu sein, die über *dyecoupling* markiert wurden. Dafür spricht auch, daß bei hochauflösenden Aufnahmen, Wolframpartikel in diesen Zellen gefunden wurden. Wenn es andere Neurone wären, dürfte nicht nur das Soma, sondern müßte die gesamte Zelle mit Dendritenbaum angefärbt sein. Diese Zellen sind also nicht, wie beim *dyecoupling* scheinbar ohne Fortsätze, sondern sie besitzen tatsächlich keine.

Deshalb könnte es sich bei diesen Zellen um Mikroglia handeln. Mikrogliale Zellen sind die Haupteffektoren des Immunsystems im Gehirn (Giulian, 1987). Momentan herrscht die Meinung vor, daß die meisten Mikrogliazellen den, im Knochenmark gebildeten und anschließend im Blut zirkulierenden, Monocyten entstammen. Die wiederum wandern während der frühen Phase der Gehirnentwicklung in dieses ein (Squire et al., 2003). Die Morphologie dieser Zellen ist vielgestaltig. Die ruhenden Mikrogliazellen können rund oder stäbchenförmig sein und besitzen keine oder nur wenige Fortsätze, ähnlich den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Zellen, während die aktivierte Mikroglia ähnliche Charakteristika wie Makrophagen hat (Squire et al., 2003; Stein et al., 2006). Des weiteren sind 5 bis 20 Prozent aller Zellen im Mausokortex Mikrogliazellen (Squire et al., 2003). Das würde die große Anzahl der beobachteten Zellen in allen hier untersuchten Entwicklungsstadien erklären.

### **5.3. Die Auswirkungen des Fehlens von *ephrinA5* auf die Entwicklung der Sternzellen in Schicht 4**

#### **5.3.1. Molekulare Mechanismen der Dendriten- und Spine-Entwicklung**

Beide, *in-vivo*- und *in-vitro*-Daten zeigen, daß die *Eph*-Rezeptoren und ihre Liganden, die *ephrine*, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Dendriten sowie der Reifung und Stabilisierung der Spines spielen. So führt zum einen, die Aktivierung der *EphB*-Rezeptoren durch rekombinantes *ephrinB2*, *in vitro*, zur Reduzierung der filopodienartigen Strukturen und die Anzahl der Spines steigt. Später in der Entwicklung induziert die Applikation von *ephrinB2*-Fc die Reifung der Spines. Sie werden kürzer und bekommen größere Köpfe (Henkemeyer et al., 2003). Zum anderen führt der Dreifach-Knockout von *EphB1*, *EphB2* und *EphB3*, *in vitro*, zum völligen Fehlen von Spines und *in vivo* werden zwar noch Spines gebildet, diese sind aber deformiert. Ebenso sind die Dendritenbäume in dieser Mausmutante verändert. Dissoziierte Neurone weisen eine Reduktion in der Länge der Dendriten sowie in der Anzahl der primären Dendriten auf (Hoogenraad et al., 2005).

Es stellt sich nun die Frage, wie der *ephrinA5*-Knockout das *ephrin/Eph*-System beeinflusst. Der Ausfall dieses Gens könnte durch andere Mitglieder des *ephrin/Eph*-Systems kompensiert werden, da das Bindungsverhalten von Ligand und Rezeptor innerhalb einer Klasse promiskuitiv ist. Expressionsanalysen an der in dieser Arbeit verwendeten *ephrinA5*-Knockout-Maus zeigen, daß im somatosensorischen Cortex (S1) zahlreiche Gengruppen differentiell exprimiert sind. Viele dieser Gruppen stehen in engem Zusammenhang mit der Entwicklung und Funktion des Nervensystems. Dabei sind allein im *ephrin/Eph*-System von den 15 untersuchten Genen drei heraufreguliert. Darüber hinaus werden auch intrazelluläre Signalmoleküle differentiell exprimiert, die unter anderem auch im *downstream signaling* der *Eph*-Rezeptoren involviert sind (Peuckert, 2007). Die veränderte Expression dieser Gene könnte mitverantwortlich dafür sein, daß sich die Dendriten der Sternzellen in Schicht 4 stärker verzweigen sowie zunächst mehr Filopodien bilden und später in der Entwicklung weniger Spines besitzen.

So ist der *EphB6*-Rezeptor im S1-Cortex generell stärker exprimiert (Peuckert, 2007). Dieser Rezeptor besitzt eine inaktive Kinase, kann aber durch einen katalytisch aktiven *EphB*-Rezeptor transphosphoryliert werden. Dabei bildet sich ein stabiler Hetero-Komplex aus (Freywald et al., 2002). Da *EphB1*, *B2*, *B3* und *B4* ebenfalls in der Schicht 4 gebildet werden (Peuckert, 2007), könnte, durch das Heraufregulieren von *EphB6* im *ephrinA5*-Knockout,

eine möglicherweise zunehmende Interaktion von *EphB6* mit den anderen *EphB*-Rezeptoren, Auswirkungen auf die Ausbildung der Dendriten und Spines haben.

Zusätzlich könnte die Wirkung kinasedefizienter Rezeptoren darin bestehen, daß die Signaltransduktion in Richtung *Reverse Signaling* durch aktivierte Liganden verschoben ist (Pasquale, 2005). Grunwald et al. (2004) konnte zeigen, daß *ephrinB*-Liganden auf den Spines hippocampaler Neurone für die synaptische Plastizität notwendig sind. Alle drei *B-ephrine* haben eine Bindungsstelle für PDZ-Domänen an ihrem carboxyterminalen Ende, mit der sie einige Komponenten des *Postsynaptic Density*, welche eine solche PDZ-Domäne enthalten, wie z.B. *GRIP1* und *GRIP2*, *Pick1* und *Syntenin* binden können, um über diese verschiedene Signalkaskaden zu initialisieren (Ethell und Pasquale, 2005). Mittels *in-situ*-Hybridisierungen wurde *ephrinB2* auch in der Schicht 4 des somatosensorischen Cortex nachgewiesen (Peuckert, 2007).

Im Gegensatz zur allgemein erhöhten Expression von *EphB6* in S1, werden *EphA5* und *ephrinA2* schichtspezifisch verstärkt gebildet. Dabei ist besonders *ephrinA2* interessant, dessen Expression in der Schicht 4 erhöht ist. Das könnte zu einer verstärkten Aktivierung von *EphA*-Rezeptoren auf den Sternzellen und zu der beobachteten Reduzierung der Spinedichte führen. Diese andere Gruppe der *Eph*-Rezeptor-Tyrosinkinasen sind ebenfalls bedeutend für die Spineentwicklung und Plastizität. Während der Rezeptor *EphA4* auf den Spines vorkommt, ist der Ligand *ephrinA3* auf den Fortsätzen von Astrozyten, welche die Spines umhüllen, lokalisiert. Die Gabe von *ephrinA3* zu hippocampalen Schnitten führt zu einer Verkürzung der Spines und zum anderen wird die Spinedichte reduziert. Im Gegensatz dazu führt *in vivo* der Knockout von *EphA4* zur Verlängerung der Spines und die Spinedichte erhöht sich (Murai et al., 2003). Diese repulsive *ephrinA3/EphA4*-vermittelte Interaktion zwischen Astrozyten und hippocampalen Neuronen ist also entscheidend für die Organisation der Spines.

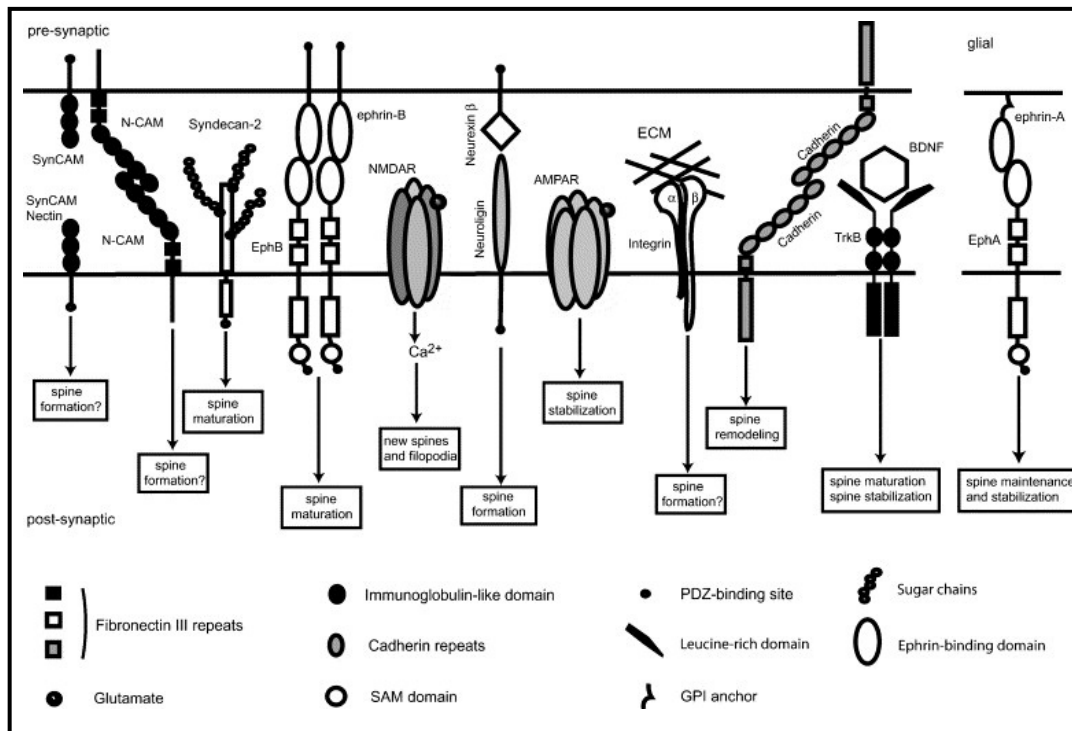
Ein weiteres, durch Peuckert (2007) identifiziertes, differentiell exprimiertes Molekül in der *ephrinA5*-Knockout-Maus ist *PAK3* (p21 aktivierte Kinase 3). *PAK3* ist ein *downstream* Effektor von *Rac*. Diese GTPase gehört zum Signaltransduktionsweg, der durch die Tyrosinkinase der *EphB*-Rezeptoren initialisiert wird. Aktiviertes *PAK3* fördert die Ausbildung von dendritischen Fortsätzen durch die Phosphorylierung von *Myosin II Regulatory Light Chain (MLC)* (Zhang et al., 2005). Somit könnte die stärkere Expression von *PAK3* in der Mutante, an der vermehrten Filopodienbildung und an der verstärkten Verzweigung der Dendriten beteiligt sein.

Darüber hinaus gibt es natürlich noch eine Vielzahl molekularer Signale und Rezeptoren, welche die Entwicklung der Dendriten und Spines beeinflussen. So wirkt z.B. *Semaphorin 3A* chemoattraktiv auf die Dendriten corticaler Pyramidenzellen. Interessanterweise wirkt es zum selben Zeitpunkt repulsiv auf die Axone dieser Neurone. Dabei ist die lösliche Guanylatcyclase der Mediator dieser Effekte. Hohe Konzentration an cGMP in den Dendriten und niedrige Konzentration in den Axonen führen zu den gegensätzlichen Effekten, die dafür sorgen, daß die Dendriten in Richtung Pia wachsen und die Axone von ihr weg (Polleux et al., 2000).

Neben dem *ephrin-* und *Semaphorinsystem* gibt es ein weiteres Axon-Lenkungssystem, *Slit1-Robo*, welches auch die Entwicklung der Dendriten beeinflusst. *In vitro* stimuliert *Slit1* das Auswachsen und Verzweigen der Dendriten corticaler Neurone. Umgekehrt führt die Inhibierung der *Slit-Robo*-Interaktion zu einer Verminderung der dendritischen Verzweigung (Whitford et al., 2002).

Ebenso spielen Wachstumsfaktoren, wie die Mitglieder der *Neurotrophin*-Familie eine Rolle bei der Entwicklung von Dendriten und Spines. So führt die Überexpression von *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* in einzelnen corticalen Neuronen in *Slice*-Kulturen zu einer Zunahme des dendritischen Wachstums in unmittelbarer Umgebung der transfizierten Neurone (Horch und Katz, 2002). McAllister et al. (1997) konnten zeigen, daß die *Neurotrophine* nicht generell das Wachstum der Dendriten induzieren, sondern auch für das schichtspezifische Wachstum verantwortlich sind. So exprimieren die Neurone in jeder Schicht des Cortex verschiedene *Neurotrophine* und deren Rezeptoren. In Schicht 4 inhibiert *NT3* das durch *BDNF* induzierte dendritische Wachstum. Im Gegensatz dazu inhibiert *BDNF* in Schicht 6 das durch *NT3* induzierte dendritische Wachstum. Die Überexpression von *BDNF* führt zur Destabilisierung dendritischer Spines in corticalen Schnitten. Die Zellen weisen weniger Spines auf, welche sehr schnell gebildet und wieder zurückgezogen werden (Horch et al., 1999).

Weiterhin gibt es noch verschiedene Zelladhäsionsmoleküle, wie die *Cadherine* und deren Partner die  $\beta$ -*Catenine*, die eine Rolle bei der Stabilisierung der Dendriten und Spines spielen (Abe et al., 2004; Togashi et al., 2002; Yu und Malenka, 2003) und diverse Rezeptoren für extrazelluläre Matrixproteine, wie die *Integrine*, welche wichtig für die Bildung von Spines sind (Costa et al., 2001; Liu et al., 2001; Nakagami et al., 2000; Seil, 1998).



**Abb. 5.1:** Oberflächenmoleküle die in die Entwicklung der Dendriten und Spines involviert sind. Nach Ethell und Pasquale (2005).

### 5.3.2. Aktivitätsabhängige Regulation der Dendriten- und Spine-Entwicklung

Neben den Molekülen auf der Zelloberfläche, welche den physischen Kontakt zwischen den Zellen vermitteln, ist auch die Aktivität der Neurone für die Entwicklung des Dendritenbaumes und dessen Fortsätze von entscheidender Bedeutung. In vielen Fällen entspricht der Zeitabschnitt des maximalen dendritischen Wachstums dem der afferenten Innervation (Miller und Kaplan, 2003). Deprivationsexperimente zeigen, daß der Verlust normaler Aktivität während der Entwicklung zu Veränderungen der Dendritenbäume führt. So hat die monokulare Deprivation bei Katzen eine starke Auswirkungen auf die Dendritenbäume der Sternzellen in Schicht 4 des primären visuellen Cortex. Normalerweise bleiben die Dendriten der Zellen, welche sich nahe der Grenze zwischen benachbarten okularen Dominanzsäulen befinden, in der entsprechenden Säule. Die monokulare Deprivation schwächt nun den Einfluß dieser Grenze auf die Dendritenbäume. Die Sternzellen in der Säule vom deprivierten Auge verlängern ihre Dendriten hauptsächlich in die benachbarte Säule des offenen Auges (Kossel et al., 1995). Ähnliche Mechanismen könnten dafür verantwortlich sein, daß sich die Dendriten der Sternzellen durch den reduzierten thalamischen Input in der *ephrinA5*-Knockout-Maus stärker verzweigen.

Weiterhin zeigen *in-vitro*-Untersuchungen, daß Neurone auf das Fehlen von elektrischer Aktivität mit vermehrter Filopodienbildung reagieren. Wenn hippocampale Schnitte von Ratten in calciumfreiem Medium mit Glutamatrezeptor-Antagonisten sowie Natrium- und Calciumkanal-Blockern kultiviert werden, weisen die Zellen an ihren Dendriten mehr Filopodien auf als die Zellen im Kontrollmedium. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß die neuen Filopodien auch synaptischen Kontakt zu den Afferenzen ausbilden (Petrak et al., 2005). Lohmann et al. (2005) konnte zeigen, daß die Motilität der Filopodien mit den lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Dendriten korreliert. In hippocampalen Schnitten von neonatalen Ratten sind diese Ereignisse selten, bevor einzelne Filopodien anfangen auszuwachsen. Die Frequenz der Transienten steigert sich mit dem Wachstum der Filopodien und führt schließlich zum Stoppen des Wachstums. Wenn nun die Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten experimentell verändert wird, führt die Reduzierung zum Auswachsen der Filopodien und das Freisetzen von  $\text{Ca}^{2+}$  reduziert hingegen die Motilität der Filopodien und stabilisiert die Vorhandenen. Das würde dafür sprechen, daß junge Neurone solange Filopodien ausbilden, bis ein bestimmter Level an  $\text{Ca}^{2+}$  und damit einhergehend ein bestimmtes Maß an Aktivität erreicht ist.

Später ist auch die Stabilität der dendritischen Spines von der neuronalen Aktivität abhängig. So zeigen Stimulierungs-Experimente an hippocampalen Slice-Kulturen, daß eine hochfrequente Stimulierung, was zur synaptischen Langzeit-Potenzierung (LTP) führt, vorhandene Spines stabilisiert und die Bildung neuer Spines induziert (Maletic-Savatic et al., 1999). Eine niederfrequente Stimulierung, welche eine Langzeit-Depression induziert, führt hingegen zu einer Rückbildung von Spines (Zhou et al., 2004). Engert und Bonhoeffer (1999) nutzten ein System, das ihnen erlaubte die synaptische Aktivität und damit den Ort der LTP-Induktion auf einen kleinen Bereich des Dendriten der postsynaptischen Zelle zu begrenzen. Die hippocampalen Schnitte wurden in einer Lösung inkubiert, welche die Freisetzung von Neurotransmittern unterdrückte, außer in einem kleinen Bereich von etwa  $30\mu\text{m}$ , in dem durch die Zugabe einer Lösung, wie sie auch im Gehirn vorkommt, die Synapsen normal funktionierten. Die lokale synaptische Aktivierung wurde dann mit depolarisierenden Impulsen einer intrazellulären Elektrode gepaart und damit LTP induziert. 30min später konnte beobachtet werden, daß nur in diesem kleinen Bereich neue Spines gebildet wurden. Aber die Zugabe von AP5 (D(-)-2-Amino-5-Phosphonovalerat), was *NMDA*-Rezeptoren blockiert, verhindert die Bildung von neuen Spines. Das zeigt, daß der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  wichtig für diesen Prozeß ist. Diese Mechanismen, welche aktive Verbindungen stabilisieren

und nicht genutzte Verknüpfungen lösen, spielen vor allem eine Rolle bei der neuronalen Plastizität sowie beim Lernen und dem Gedächtnis.

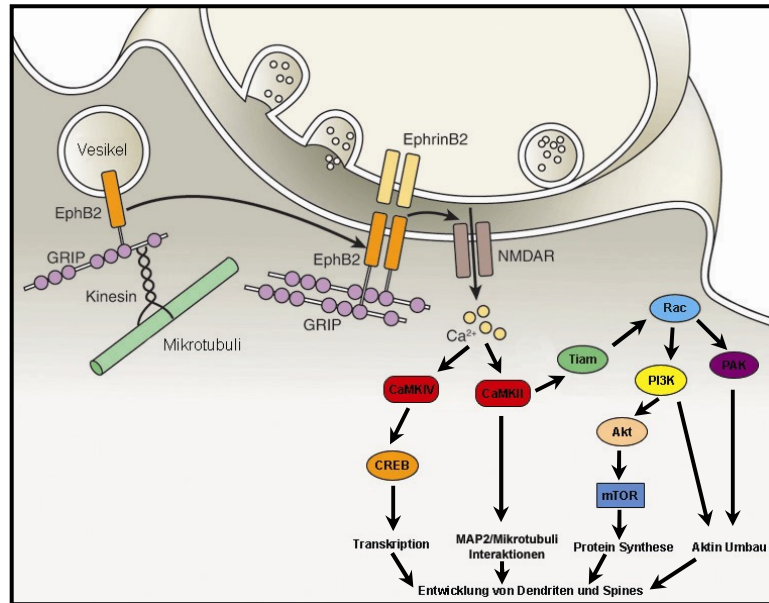
Diese aktivitätsabhängigen Effekte werden also durch Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst. Das zeigt, daß natürlich die aktivitätsabhängige Regulation der Dendriten- und Spineentwicklung auch von Molekülen abhängig ist und es somit keine strenge Trennung dieser beiden Mechanismen geben kann.

$\text{Ca}^{2+}$  kommt durch neurotransmitter-gesteuerte Ionenkanäle, wie dem *NMDA*-Rezeptor oder durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Zelle, wo es wiederum  $\text{Ca}^{2+}$  aus internen Speichern freisetzen kann, welches dann die Aktin-Dynamik in den Dendriten und Filopodien bzw. Spines beeinflusst. Dazu bindet Calmodulin mehrere Calcium-Ionen und kann verschiedene intrazelluläre Effektoren aktivieren, wie z.B. die *Calcium/Calmodulin-Dependent Protein kinases* (*CaMKs*) und die *Mitogen-Activated Kinase* (*MAPK*) (Konur und Ghosh, 2005; Miller und Kaplan, 2003). *In-vivo*-Untersuchungen bei *Xenopus* zeigen, daß verstärkte *CaMKII*-Aktivität die Wachstumsrate der Dendriten junger Neurone verlangsamt. Überexpression von *CaMKII* in älteren Neuronen stabilisiert die Dendriten, während die Inhibition der Kinase das Wachstum der Dendriten verstärkt. Sie wirkt also als aktivitätsabhängiger Mediator der neuronalen Reifung (Wu und Cline, 1998). Außerdem gibt es auch andere aktin-regulierende Proteine, die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiv sind, wie z.B. *Gelsolin*, *Profilin*, *Spectrin*,  $\alpha$ -*Actinin* oder *Calponin*. Diese Proteine werden durch verschiedene Level und Dauer von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen aktiviert was in den unterschiedlichen Reaktionen des Zytoskeletts resultiert (Oertner und Matus, 2005).

Die *NMDA*-Rezeptoren und damit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom werden wiederum durch *EphB*-Rezeptoren moduliert. Somit konvergieren aktivitätsabhängige und -unabhängige Signale und regulieren die Entwicklung der Dendriten und Spines. *GRIP1*, ein Bestandteil des *Postsynaptic Density*, das über seine PDZ-Domäne an *EphB*-Rezeptoren und auch *ephrinB*-Liganden bindet, wirkt als *Kinesin*-Adapter für Vesikel, die *EphB2* transportieren. Durch die Verbindung von *GRIP1* mit *EphB2* und dem *Kinesin* werden die Transport-Vesikel entlang der Mikrotubuli zur Membran transportiert und der Rezeptor als Komplex mit *GRIP1* dort eingebaut (Hoogenraad et al., 2005; Misra und Ziff, 2005). Die Interaktion der B-*ephrine* mit *EphB2* induziert die Cluster-Bildung von *EphB2* mit dem *NMDA*-Rezeptor, was wiederum den Calcium-Einstrom durch den *NMDA*-Rezeptor in die Zelle erhöht (Dalva et al., 2000; Grunwald et al., 2001). Daraufhin interagiert *TIAM 1* mit dem *NMDA*-Rezeptor und wird von *CaMKII* phosphoryliert. *TIAM 1* aktiviert seinerseits *Rac1*, was zum einen über *PAK* die

Actin-Polymerisation reguliert und zum anderen über die *PI3K* und *Akt* die Proteinsynthese beeinflusst (Abb. 5.2) (Tolias et al., 2005). Der Knockdown von *GRIP1* (Hoogenraad et al., 2005) und *TIAM 1* (Tolias et al., 2005) in hippocampalen Neuronen führt in beiden Fällen zu einer Vereinfachung des Dendritenbaumes und zur Reduzierung der Spinedichte.

Die Entwicklung von Spines und Dendriten ist also ein hochdynamischer Prozeß der sowohl durch aktivitätsabhängige als auch unabhängige Signale gesteuert wird. Beide



**Abb. 5.2** : Regulation des Actin-Zytoskeletts durch das Zusammenspiel aktivitätsabhängiger und -unabhängiger Signale. *GRIP1* wirkt als Adapter zwischen vesikulären *EphB2* und einem Kinesin während des Transports entlang der Mikrotubuli. *EphB2* wird zusammen mit *GRIP1* als Komplex in die Plasmamembran eingebaut. Nach der Aktivierung von *EphB2* durch *B-ephrine* bindet *EphB2* an den *NMDA*-Rezeptor und moduliert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der *TIAM 1* kontrolliert, welches *Rac* aktiviert, einen Actin-Regulator und weiterhin über die *PI3K* die Proteinsynthese beeinflusst. Außerdem wird über *CaMKIV* der Transkriptionsfaktor *CREB* aktiviert. Verändert nach Miller und Kaplan, 2003; Misra und Ziff, 2005; Tolias et al. (2005).

Regulationsmechanismen sind in der hier untersuchten *ephrinA5*-Knockout-Maus gestört. Die veränderte Expression von verschiedenen *ephrinen* und *Eph*-Rezeptoren sowie die verminderte Aktivität, hervorgerufen durch den reduzierten thalamischen Input, im somatosensorischen Cortex dieser Maus beeinflussen die Sternzellen in Schicht 4 dahingehend, daß sie im frühen postnatalen Stadium vermehrt Filopodien bilden und sich die Dendriten stärker verzweigen. Der Einfluß des reduzierten thalamischen Inputs in der Mutante würde für das Model „Filopodien als Spine-Vorläufer“ sprechen. Zumindest die hier untersuchten Sternzellen scheinen über ihre dendritischen Filopodien synaptischen Kontakt mit den axonalen Efferenzen auszubilden, da sie bei weniger Input mehr Filopodien ausbilden und damit versuchen eine größere Anzahl von Kontakten herzustellen. Das dadurch auch mehr stabile Kontakte zustande kommen scheint nicht der Fall zu sein, da später in der Entwicklung die Dendriten der Zellen in der Mutante immer noch stärker verzweigt sind, als die der Zellen im Wildtyp, aber nur halb so viele Spines ausbilden. Somit scheint es, daß aufgrund der verminderten Verzweigung der thalamischen Afferenzen oder einer vielleicht zunehmenden repulsiven Interaktion zwischen Astrocyten und Neuronen zu wenig



synaptische Kontakte geknüpft werden können. Durch die veränderte Expression in der Mutante könnte es aber auch zu einer Verstärkung der vorhandenen Kontakte kommen, z.B. durch eine zunehmende Interaktion von *Eph*- und *NMDA*-Rezeptoren und den damit ansteigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.

Um aufzuklären welchen Einfluß jeweils aktivitätsabhängige und unabhängige Faktoren auf die Entwicklung der Sternzellen haben, könnten weiterführende *slice-overlay*-Experimente klären. Hierbei werden postnatale Gehirnschnitte in Kultur genommen und auf diesen Schnitten embryonale Einzelzellen vom somatosensorischen Cortex, welche z.B. EGFP als Marker exprimieren, ausgesät. Von den Sternzellen, die in Schicht 4 des Schnittes adhärieren, werden dann Wachstum und Verzweigung der Dendriten, sowie die Anzahl der Filopodien bzw. Spines ausgewertet. Durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten mit den Zellen und Schnitten aus Mutante und Wildtyp, könnten die einzelnen Einflüsse der unterschiedlichen Faktoren untersucht werden. So könnten Zellen aus dem Wildtyp auf Schnitten des Wildtyps kultiviert werden, denen der Thalamus fehlt und somit die Auswirkungen der fehlenden Aktivität untersucht werden. Um weiterhin den Einfluß der aktivitätsunabhängigen Effekte des Knockouts zu untersuchen, würden Zellen aus der Mutante auf Wildtypschnitten mit Thalamus kultiviert werden. Ebenso könnte untersucht werden, ob es auch Unterschiede in der Entwicklung der Zellen gibt, wenn diese auf Schnitten der Mutante mit Thalamus (reduzierter thalamischer Input) oder ohne Thalamus (fehlender thalamischer Input) auswachsen. Die zwei Kontrollen, welche sich auf alle Fälle in der Morphologie unterscheiden sollten, wenn dieser Versuchsansatz aussagekräftig ist, wären die Zellen des Wildtyps auf Schnitten des Wildtyps mit Thalamus kultiviert und die Zellen der Mutante auf Schnitten der Mutante mit Thalamus kultiviert.

## 6. Zusammenfassung

Während ihrer Entwicklung bilden die Neurone Dendriten aus, die sich immer stärker verzweigen und mit hoch motilen Filopodien bedeckt sind. Nachdem diese dendritischen Filopodien synaptischen Kontakt mit ihren axonalen Partnern ausgebildet haben, werden sie durch Spines ersetzt, welche die postsynaptische Seite der meisten excitatorischen Synapsen repräsentieren. Die Morphogenese der Dendriten und Spines wird einerseits durch den Kontakt mit ihrer Umgebung, vermittelt durch Oberflächenmoleküle, wie die *ephrine* und ihre Rezeptoren und andererseits durch neuronale Aktivität bestimmt. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe mit der *ephrinA5*-Knockout-Maus konnten zeigen, daß im somatosensorischen Cortex die thalamischen Axone weniger stark verzweigen und einige Mitglieder der *ephrin*-Familie ein verändertes Expressionsmuster aufweisen (Mühlfriedel, 1999; Peuckert, 2007). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die Sternzellen in der Schicht 4, den Zielzellen der thalamocorticalen Projektion, zu untersuchen.

In der ersten Versuchsreihe wurde getestet, ob sich diese Neurone nach der Methode des *diolistic labeling* markieren lassen, bei der Wolframpartikel, die mit lipophilem Farbstoff beschichtet waren, mittels der *Gene-Gun* auf das Gewebe geschossen wurden. Die Zellen ließen sich am besten markieren, wenn die Mäuse kurz perfundiert wurden und somit das Gehirn leicht fixiert war, so daß die Morphologie der Zellen erhalten blieb aber die Kugeln noch tief genug in das fixierte Gewebe eindringen konnten. Die Anzahl und Dichte der markierten Zellen ließ sich über die Menge des Farbstoffs und der Kugeln, sowie über den Abstand zwischen Gehirnschnitt und *Gene-Gun* und dem Heliumdruck regulieren.

Für die quantitative Analyse der Zellmorphologie wurden die Neurone mit dem Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Am postnatalen Tag 8 (P8) waren die Dendriten der Sternzellen aus der Mutante stärker verzweigt und bildeten mehr Filopodien aus, als die der Zellen aus dem Wildtyp. Im Gegensatz dazu gab es aber keinen Unterschied in der Ausdehnung des Dendritenbaumes. Später während der Entwicklung, bei P23, sind die Dendriten in der Mutante immer noch stärker verzweigt, die Spinedichte ist aber im Vergleich zum Wildtyp auf die Hälfte reduziert. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß die Sternzellen in der Schicht 4 während der frühen Entwicklung versuchen, den durch das Fehlen von *ephrinA5* hervorgerufenen, reduzierten thalamischen Input, durch verstärkte dendritische Verzweigung und vermehrte Filopodienbildung zu kompensieren. Allerdings haben sich im reiferen Stadium nicht genug stabile Kontakte in der Mutante ausgebildet, da vielleicht

aufgrund der verminderten Verzweigung der thalamischen Afferenzen und der veränderten Genexpression zu wenig synaptische Kontakte geknüpft werden konnten. Diese Daten zeigen, daß die Morphologie der Sternzellen in der Schicht 4 durch den thalamischen Input und die *ephrine* bestimmt wird. Welches Maß an Einfluß dabei aktivitätsabhängige und -unabhängige Effekte haben, könnten weiterführende Experimente klären.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abe, K., Chisaka, O., Van Roy, F., und Takeichi, M. (2004). Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat Neurosci* 7, 357-363.
- Abram, C. L., und Courtneidge, S. A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res* 254, 1-13.
- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L., und Rubenstein, J. L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474-476.
- Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., und Rubenstein, J. L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, 353-363.
- Angevine, J. B., Jr. (1970). Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse. An autoradiographic study. *J Comp Neurol* 139, 129-187.
- Aoto, J., und Chen, L. (2006). Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions. *Brain Res.*
- Araya, R., Jiang, J., Eiselthal, K. B., und Yuste, R. (2006). The spine neck filters membrane potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17961-17966.
- Auladell, C., Perez-Sust, P., Super, H., und Soriano, E. (2000). The early development of thalamocortical and corticothalamic projections in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* 201, 169-179.
- Bagnard, D., Chounlamountri, N., Puschel, A. W., und Bolz, J. (2001). Axonal surface molecules act in combination with semaphorin 3a during the establishment of corticothalamic projections. *Cereb Cortex* 11, 278-285.
- Bagnard, D., Lohrum, M., Uziel, D., Puschel, A. W., und Bolz, J. (1998). Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125, 5043-5053.
- Bagri, A., Marin, O., Plump, A. S., Mak, J., Pleasure, S. J., Rubenstein, J. L., und Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33, 233-248.
- Bernhardt, R., und Matus, A. (1984). Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol* 226, 203-221.

- Braisted, J. E., Catalano, S. M., Stimac, R., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Shatz, C. J., und O'Leary, D. D. (2000). Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J Neurosci* 20, 5792-5801.
- Bruckner, K., Pablo Labrador, J., Scheiffele, P., Herb, A., Seeburg, P. H., und Klein, R. (1999). EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron* 22, 511-524.
- Bruckner, K., Pasquale, E. B., und Klein, R. (1997). Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275, 1640-1643.
- Carlin, R. K., Grab, D. J., Cohen, R. S., und Siekevitz, P. (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* 86, 831-845.
- Castellani, V., Yue, Y., Gao, P. P., Zhou, R., und Bolz, J. (1998). Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *J Neurosci* 18, 4663-4672.
- Catalano, S. M., Robertson, R. T., und Killackey, H. P. (1991). Early ingrowth of thalamocortical afferents to the neocortex of the prenatal rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2999-3003.
- Catalano, S. M., Robertson, R. T., und Killackey, H. P. (1996). Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 367, 36-53.
- Caviness, V. S., Jr. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res* 256, 293-302.
- Costa, E., Davis, J., Grayson, D. R., Guidotti, A., Pappas, G. D., und Pesold, C. (2001). Dendritic spine hypoplasticity and downregulation of reelin and GABAergic tone in schizophrenia vulnerability. *Neurobiol Dis* 8, 723-742.
- Cowan, C. A., und Henkemeyer, M. (2001). The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* 413, 174-179.
- Dailey, M. E., und Smith, S. J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16, 2983-2994.
- Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W., und Greenberg, M. E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103, 945-956.
- Davy, A., Gale, N. W., Murray, E. W., Klinghoffer, R. A., Soriano, P., Feuerstein, C., und Robbins, S. M. (1999). Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5

- requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev* 13, 3125-3135.
- Davy, A., und Robbins, S. M. (2000). Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *Embo J* 19, 5396-5405.
- De Carlos, J. A., und O'Leary, D. D. (1992). Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J Neurosci* 12, 1194-1211.
- DeDiego, I., Smith-Fernandez, A., und Fairen, A. (1994). Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur J Neurosci* 6, 983-997.
- Deng, J., und Elberger, A. J. (2003). Corticothalamic and thalamocortical pathfinding in the mouse: dependence on intermediate targets and guidance axis. *Anat Embryol (Berl)* 207, 177-192.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M., und Bonhoeffer, F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82, 359-370.
- Dufour, A., Seibt, J., Passante, L., Depaepe, V., Ciossek, T., Frisen, J., Kullander, K., Flanagan, J. G., Polleux, F., und Vanderhaeghen, P. (2003). Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes. *Neuron* 39, 453-465.
- Dunaevsky, A., Tashiro, A., Majewska, A., Mason, C., und Yuste, R. (1999). Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13438-13443.
- Engert, F., und Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.
- Ethell, I. M., und Pasquale, E. B. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* 75, 161-205.
- Felleman, D. J., und Van Essen, D. C. (1991). Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1, 1-47.
- Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V., und Harris, K. M. (1998). Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18, 8900-8911.
- Flanagan, J. G., und Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21, 309-345.

- Freywald, A., Sharfe, N., und Roifman, C. M. (2002). The kinase-null EphB6 receptor undergoes transphosphorylation in a complex with EphB1. *J Biol Chem* 277, 3823-3828.
- Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T. E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D. G., *et al.* (1996). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17, 9-19.
- Gan, W. B., Grutzendler, J., Wong, W. T., Wong, R. O., und Lichtman, J. W. (2000). Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. *Neuron* 27, 219-225.
- Gao, P. P., Yue, Y., Zhang, J. H., Cerretti, D. P., Levitt, P., und Zhou, R. (1998). Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: implications in the development of thalamocortical projections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5329-5334.
- Ghosh, A., und Shatz, C. J. (1992). Pathfinding and target selection by developing geniculocortical axons. *J Neurosci* 12, 39-55.
- Giulian, D. (1987). Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 18, 155-171, 132-153.
- Grunwald, I. C., Korte, M., Adelmann, G., Plueck, A., Kullander, K., Adams, R. H., Frotscher, M., Bonhoeffer, T., und Klein, R. (2004). Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat Neurosci* 7, 33-40.
- Grunwald, I. C., Korte, M., Wolfer, D., Wilkinson, G. A., Unsicker, K., Lipp, H. P., Bonhoeffer, T., und Klein, R. (2001). Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 32, 1027-1040.
- Harris, K. M., Jensen, F. E., und Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12, 2685-2705.
- Henkemeyer, M., Itkis, O. S., Ngo, M., Hickmott, P. W., und Ethell, I. M. (2003). Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol* 163, 1313-1326.
- Himanen, J. P., Chumley, M. J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W. A., Jeffrey, P. D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D. A., Boyd, A. W., *et al.* (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci* 7, 501-509.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., und Takaku, F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238, 1717-1720.

- Holland, S. J., Gale, N. W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G. D., Henkemeyer, M., and Pawson, T. (1996). Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383, 722-725.
- Hoogenraad, C. C., Milstein, A. D., Ethell, I. M., Henkemeyer, M., and Sheng, M. (2005). GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci* 8, 906-915.
- Horch, H. W., and Katz, L. C. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci* 5, 1177-1184.
- Horch, H. W., Kruttgen, A., Portbury, S. D., and Katz, L. C. (1999). Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron* 23, 353-364.
- Huai, J., and Drescher, U. (2001). An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *J Biol Chem* 276, 6689-6694.
- Irie, F., and Yamaguchi, Y. (2002). EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci* 5, 1117-1118.
- Kaech, S., Fischer, M., Doll, T., and Matus, A. (1997). Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines. *J Neurosci* 17, 9565-9572.
- Kandel, E. R., and Squire, L. R. (2000). Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. *Science* 290, 1113-1120.
- Katz, L. C. (1987). Local circuitry of identified projection neurons in cat visual cortex brain slices. *J Neurosci* 7, 1223-1249.
- Kirov, S. A., Sorra, K. E., and Harris, K. M. (1999). Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats. *J Neurosci* 19, 2876-2886.
- Klein, R. (2004). Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 16, 580-589.
- Konur, S., and Ghosh, A. (2005). Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46, 401-405.
- Kossel, A., Lowel, S., and Bolz, J. (1995). Relationships between dendritic fields and functional architecture in striate cortex of normal and visually deprived cats. *J Neurosci* 15, 3913-3926.
- Kullander, K., and Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 475-486.



- Labrador, J. P., Brambilla, R., und Klein, R. (1997). The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling. *Embo J* 16, 3889-3897.
- Lackmann, M., Oates, A. C., Dottori, M., Smith, F. M., Do, C., Power, M., Kravets, L., und Boyd, A. W. (1998). Distinct subdomains of the EphA3 receptor mediate ligand binding and receptor dimerization. *J Biol Chem* 273, 20228-20237.
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V., und Parnavelas, J. G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19, 7881-7888.
- Lendvai, B., Stern, E. A., Chen, B., und Svoboda, K. (2000). Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404, 876-881.
- Li, Z., und Sheng, M. (2003). Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 833-841.
- Liu, W. S., Pesold, C., Rodriguez, M. A., Carboni, G., Auta, J., Lacor, P., Larson, J., Condie, B. G., Guidotti, A., und Costa, E. (2001). Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3477-3482.
- Lohmann, C., Finski, A., und Bonhoeffer, T. (2005). Local calcium transients regulate the spontaneous motility of dendritic filopodia. *Nat Neurosci* 8, 305-312.
- Lopez-Bendito, G., und Molnar, Z. (2003). Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* 4, 276-289.
- Luskin, M. B., und Shatz, C. J. (1985). Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones. *J Neurosci* 5, 1062-1075.
- Mackarechtschian, K., Lau, C. K., Caras, I., und McConnell, S. K. (1999). Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression. *Cereb Cortex* 9, 601-610.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., und Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923-1927.
- Mann, F., Peuckert, C., Dehner, F., Zhou, R., und Bolz, J. (2002). Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development* 129, 3945-3955.
- Marin, O., und Rubenstein, J. L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2, 780-790.

- Marrs, G. S., Green, S. H., und Dailey, M. E. (2001). Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat Neurosci* 4, 1006-1013.
- Martinez, A., und Soriano, E. (2005). Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev* 49, 211-226.
- McAllister, A. K., Katz, L. C., und Lo, D. C. (1997). Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron* 18, 767-778.
- McConnell, S. K., Ghosh, A., und Shatz, C. J. (1989). Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245, 978-982.
- Miller, F. D., und Kaplan, D. R. (2003). Signaling mechanisms underlying dendrite formation. *Curr Opin Neurobiol* 13, 391-398.
- Miller, M., und Peters, A. (1981). Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 203, 555-573.
- Mione, M. C., Cavanagh, J. F., Harris, B., und Parnavelas, J. G. (1997). Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17, 2018-2029.
- Misra, C., und Ziff, E. B. (2005). EphB2 gets a GRIP on the dendritic arbor. *Nat Neurosci* 8, 848-850.
- Molnar, Z., Adams, R., und Blakemore, C. (1998a). Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat. *J Neurosci* 18, 5723-5745.
- Molnar, Z., Adams, R., Goffinet, A. M., und Blakemore, C. (1998b). The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse. *J Neurosci* 18, 5746-5765.
- Molnar, Z., und Butler, A. B. (2002). The corticostriatal junction: a crucial region for forebrain development and evolution. *Bioessays* 24, 530-541.
- Molnar, Z., Metin, C., Stoykova, A., Tarabykin, V., Price, D. J., Francis, F., Meyer, G., Dehay, C., und Kennedy, H. (2006). Comparative aspects of cerebral cortical development. *Eur J Neurosci* 23, 921-934.
- Mühlfriedel, S. (1999) Die Bedeutung von ephrin-A5 für die Entwicklung thalamocorticaler Projektionen., Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Mundel, P., Heid, H. W., Mundel, T. M., Kruger, M., Reiser, J., und Kriz, W. (1997). Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 139, 193-204.

- Murai, K. K., Nguyen, L. N., Irie, F., Yamaguchi, Y., und Pasquale, E. B. (2003). Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* 6, 153-160.
- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O., und Parnavelas, J. G. (2002). Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* 5, 218-224.
- Nadarajah, B., und Parnavelas, J. G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3, 423-432.
- Nakagami, Y., Abe, K., Nishiyama, N., und Matsuki, N. (2000). Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation. *J Neurosci* 20, 2003-2010.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., und Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64, 313-353.
- O'Connor, T. P., Duerr, J. S., und Bentley, D. (1990). Pioneer growth cone steering decisions mediated by single filopodial contacts in situ. *J Neurosci* 10, 3935-3946.
- Oertner, T. G., und Matus, A. (2005). Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* 37, 477-482.
- O'Leary, D. D., und Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 9, 65-73.
- Olivier, C., Cobos, I., Perez Villegas, E. M., Spassky, N., Zalc, B., Martinez, S., und Thomas, J. L. (2001). Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* 128, 1757-1769.
- Oray, S., Majewska, A., und Sur, M. (2004). Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron* 44, 1021-1030.
- Pasquale, E. B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 462-475.
- Peinado, A., Yuste, R., und Katz, L. C. (1993a). Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron* 10, 103-114.
- Peinado, A., Yuste, R., und Katz, L. C. (1993b). Gap junctional communication and the development of local circuits in neocortex. *Cereb Cortex* 3, 488-498.
- Penzes, P., Beaser, A., Chernoff, J., Schiller, M. R., Eipper, B. A., Mains, R. E., und Huganir, R. L. (2003). Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37, 263-274.

- Petrak, L. J., Harris, K. M., und Kirov, S. A. (2005). Synaptogenesis on mature hippocampal dendrites occurs via filopodia and immature spines during blocked synaptic transmission. *J Comp Neurol* 484, 183-190.
- Peuckert, C. (2007) Die Bedeutung der Ephrine und Eph-Rezeptoren für die Entwicklung des somatosensorischen Systems in der Maus und die Auswirkungen des funktionellen Knockouts von Ephrin A5 auf die Genexpression, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Polleux, F., Dehay, C., und Kennedy, H. (1997). The timetable of laminar neurogenesis contributes to the specification of cortical areas in mouse isocortex. *J Comp Neurol* 385, 95-116.
- Polleux, F., Morrow, T., und Ghosh, A. (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404, 567-573.
- Portera-Cailliau, C., Pan, D. T., und Yuste, R. (2003). Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci* 23, 7129-7142.
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., und Rubenstein, J. L. (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424, 409-438.
- Rakic, P. (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183, 425-427.
- Rakic, P. (1977). Prenatal development of the visual system in rhesus monkey. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278, 245-260.
- Rao, A., Kim, E., Sheng, M., und Craig, A. M. (1998). Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 18, 1217-1229.
- Rebsam, A., Seif, I., und Gaspar, P. (2002). Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. *J Neurosci* 22, 8541-8552.
- Salter, M. W., und Kalia, L. V. (2004). Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 5, 317-328.
- Scannevin, R. H., und Huganir, R. L. (2000). Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 1, 133-141.
- Scott, E. K., und Luo, L. (2001). How do dendrites take their shape? *Nat Neurosci* 4, 359-365.

- Segev, I., und Rall, W. (1998). Excitable dendrites and spines: earlier theoretical insights elucidate recent direct observations. *Trends Neurosci* 21, 453-460.
- Seil, F. J. (1998). The extracellular matrix molecule, laminin, induces purkinje cell dendritic spine proliferation in granule cell depleted cerebellar cultures. *Brain Res* 795, 112-120.
- Sekerkova, G., Loomis, P. A., Changyaleket, B., Zheng, L., Eytan, R., Chen, B., Mugnaini, E., und Bartles, J. R. (2003). Novel espin actin-bundling proteins are localized to Purkinje cell dendritic spines and bind the Src homology 3 adapter protein insulin receptor substrate p53. *J Neurosci* 23, 1310-1319.
- Shamah, S. M., Lin, M. Z., Goldberg, J. L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R. L., Corfas, G., Debant, A., und Greenberg, M. E. (2001). EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105, 233-244.
- Song, J., Vranken, W., Xu, P., Gingras, R., Noyce, R. S., Yu, Z., Shen, S. H., und Ni, F. (2002). Solution structure and backbone dynamics of the functional cytoplasmic subdomain of human ephrin B2, a cell-surface ligand with bidirectional signaling properties. *Biochemistry* 41, 10942-10949.
- Sorra, K. E., und Harris, K. M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10, 501-511.
- Sotelo, C. (1990). Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol* 153, 225-249.
- Squire, L. R., Bloom, F. E., McConnell, S. K., Roberts, J. L., Spitzer, N. C., und Zigmond, M. J. (2003). *Fundamental Neuroscience*, Academic Press).
- Stein, V. M., Baumgartner, W., Kreienbrock, L., Zurbriggen, A., Vandeveld, M., und Tipold, A. (2006). Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function? *Vet Immunol Immunopathol* 113, 277-287.
- Steward, O., und Schuman, E. M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24, 299-325.
- Stoykova, A., und Gruss, P. (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14, 1395-1412.
- Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., und Rubenstein, J. L. (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126, 3359-3370.

- Svoboda, K., Tank, D. W., und Denk, W. (1996). Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science* 272, 716-719.
- Takacs, J., Gombos, G., Gorcs, T., Becker, T., de Barry, J., und Hamori, J. (1997). Distribution of metabotropic glutamate receptor type 1a in Purkinje cell dendritic spines is independent of the presence of presynaptic parallel fibers. *J Neurosci Res* 50, 433-442.
- Tan, S. S., Kalloniatis, M., Sturm, K., Tam, P. P., Reese, B. E., und Faulkner-Jones, B. (1998). Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* 21, 295-304.
- Tanaka, M., Ohashi, R., Nakamura, R., Shinmura, K., Kamo, T., Sakai, R., und Sugimura, H. (2004). Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *Embo J* 23, 1075-1088.
- Tarrant, S. B., und Routtenberg, A. (1979). Postsynaptic membrane and spine apparatus: proximity in dendritic spines. *Neurosci Lett* 11, 289-294.
- Tessier-Lavigne, M., und Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., und Takeichi, M. (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35, 77-89.
- Tolias, K. F., Bikoff, J. B., Burette, A., Paradis, S., Harrar, D., Tavazoie, S., Weinberg, R. J., und Greenberg, M. E. (2005). The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron* 45, 525-538.
- Torii, M., und Levitt, P. (2005). Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron* 48, 563-575.
- Torres, R., Firestein, B. L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E. N., Hugarir, R. L., Bredt, D. S., Gale, N. W., und Yancopoulos, G. D. (1998). PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* 21, 1453-1463.
- Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., und Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420, 788-794.
- Uziel, D., Garcez, P., Lent, R., Peuckert, C., Niehage, R., Weth, F., und Bolz, J. (2006). Connecting thalamus and cortex: the role of ephrins. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288, 135-142.

- Uziel, D., Muhlfridel, S., Zarbalis, K., Wurst, W., Levitt, P., und Bolz, J. (2002). Miswiring of limbic thalamocortical projections in the absence of ephrin-A5. *J Neurosci* 22, 9352-9357.
- Van Eden, C. G., Mrzljak, L., Voorn, P., und Uylings, H. B. (1989). Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *J Comp Neurol* 289, 213-227.
- Vanderhaeghen, P., Lu, Q., Prakash, N., Frisen, J., Walsh, C. A., Frostig, R. D., und Flanagan, J. G. (2000). A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nat Neurosci* 3, 358-365.
- Vaughn, J. E. (1989). Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse* 3, 255-285.
- Whitford, K. L., Marillat, V., Stein, E., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Chedotal, A., und Ghosh, A. (2002). Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron* 33, 47-61.
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M., Herrera, D. G., und Alvarez-Buylla, A. (1999). Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* 2, 461-466.
- Wu, G. Y., und Cline, H. T. (1998). Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science* 279, 222-226.
- Wyszynski, M., Kharazia, V., Shangvi, R., Rao, A., Beggs, A. H., Craig, A. M., Weinberg, R., und Sheng, M. (1998). Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain. *J Neurosci* 18, 1383-1392.
- Yu, X., und Malenka, R. C. (2003). Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci* 6, 1169-1177.
- Yuste, R., und Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* 5, 24-34.
- Zarbalis, K. (2000) Molekulare und funktionale Analyse des Ephrin-A5-Gens der Maus, Dissertation, Technische Universität München, München.
- Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S., und Horwitz, A. F. (2005). A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci* 25, 3379-3388.
- Zhou, Q., Homma, K. J., und Poo, M. M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749-757.

- Zipfel, W. R., Williams, R. M., Christie, R., Nikitin, A. Y., Hyman, B. T., und Webb, W. W. (2003). Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7075-7080.
- Zisch, A. H., Kalo, M. S., Chong, L. D., und Pasquale, E. B. (1998). Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene* *16*, 2657-2670.
- Ziv, N. E., und Smith, S. J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* *17*, 91-102.



## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AEP	Area Entopedunculare
Bidest	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CP	corticale Platte
DiA	4-(4-(dihexadecylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales Kälberserum
GABA	γ-Aminobuttersäure
GBSS	Gey's balanced salt solution
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HBSS	Hanks' balanced salt solution
kb	Kilobasen
LGE	laterale ganglionische Eminenz
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung
M	Molar
MGE	mediale ganglionische Eminenz
min	Minuten
mM	Milimolar
mRNA	Boten-RNA
MW	Molekulargewicht
MZ	Marginalzone
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol-Gemisch
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S1	somatosensorischer Cortex
SVZ	Subventrikulärzone
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
ü.N.	über Nacht
VZ	Ventrikularzone
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

**8.2. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Bearbeitung und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Judith Rudolph bei der Bearbeitung und Auswertung der Daten, die von den P23-Mäusen gewonnen wurden.
2. Patricia Pestana Garcez bei der Herstellung der embryonalen Leberkulturen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt.

Jena, den 12. Juni 2007

André Güllmar

### **8.3. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena erstellt.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Bolz für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit an seinem Institut durchzuführen, wobei ich eine Vielzahl neuer Methoden erlernt habe. Bei unseren Diskussionen war seine konstruktive Kritik stets sehr nützlich. Darüber hinaus möchte ich ihm sehr für die ausdauernde finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danken.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Tina Rüdiger und Geraldine Zimmer, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben. Danke, daß ich zu euch mit allen möglichen Problemen kommen konnte. Laura Carranza Lopez danke ich für die oft sehr amüsante Zusammenarbeit und dem „Spanischunterricht“, bei dem ich alle in Spanien wichtigen Redewendungen gelernt habe. Ebenso danke ich Ronny Niehage, der auf eine unverwechselbare Art und Weise den Laboralltag auflockern kann. Patricia Pestana Garcez und Judith Rudolph möchte ich für die sehr gute und freundschaftliche Atmosphäre bei der Bearbeitung unserer gemeinsamen Projekten danken. Die Arbeit mit euch allen hat mir riesigen Spaß gemacht.

Unserer Sekretärin Frau Behr möchte ich für ihre freundliche Unterstützung bei all den organisatorischen Dingen danken, welche von den Bestellungen für das Labor bis hin zur persönlichen „Wasserversorgung“ reichten. Weiterhin danke ich Frau Raue für die vielen kleinen aber trotzdem sehr wichtigen Laborarbeiten.

Mein Dank gilt auch Dr. Franco Weth, seines Zeichens ein wandelndes Lexikon, für die Lösung zahlreicher methodischer Probleme. Des weiteren möchte ich mich bei den anderen Mitgliedern der Nachwuchsgruppe „Neurogenetik“ vor allem für die Übernahme meiner mittäglichen Versorgung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer schulde ich Dank für die gründliche Einführung in die Bedienung des Laser-Scanning-Mikroskops, welches eine Grundlage meiner Arbeit darstellte. Auch hier gilt mein Dank den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, vor allem Michael Dietzsch und meinem Rumpelkumpel Dirk Lehnert für die sportiven Pausen und vieles mehr.

Weiterhin danke ich Dr. Andreas Henke für die Unterweisung und Bereitstellung der *Gene-Gun*, einem anderen grundlegenden Gerät meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. Siegrid Löwel und Herrn Prof. Dr. Mark Hübener danke ich für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Einen Dank auch an meine Freunde, die mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, auf deren Hilfe ich immer zählen konnte und die immer hinter mir standen. Ihre Unterstützung hat mir das alles erst ermöglicht.

## **8.4. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

André Güllmar  
geb. 18.05.1976 in Leinefelde/ Thüringen

### **Ausbildung**

1982-1990	Polytechnische Oberschule in Leinefelde
1990-1991	Leistungsklasse an Realschule in Leinefelde
1991-1994	Staatliches Gymnasium in Leinefelde
1995-2001	Biologiestudium (Diplom) an der Friedrich Schiller Universität Jena Biologisch-Pharmazeutische Fakultät  Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Mediz. Mikrobiologie Zoologie Neurobiologie
2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der medizinischen Molekularbiologie an der Medizinischen Universität zu Lübeck
ab 2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Allgemeinen Zoologie und Tierphysiologie an der Universität Jena mit dem Ziel einer Promotion

### **Sonstiges**

1994-1995	Grundwehrdienst in der Bundeswehr
-----------	-----------------------------------

### **8.5. Eigene Publikationen**

1. Bolz, J., D. Uziel, S. Mühlfriedel, A. Güllmar, C. Peuckert, K. Zarbalis, W. Wurst, M. Torii, P. Levitt  
*Multiple roles of ephrins during the formation of thalamocortical projections: maps and more.* J Neurobiol, 2004. **59**(1): p. 82-94
2. Güllmar, A., J. Rudolph, and J. Bolz  
*Miswiring of thalamocortical projections and cortical circuits in ephrinA5 knockout mice* in **5th Forum of European Neuroscience**. Vienna, 2006
3. Güllmar, A., J. Rudolph, and J. Bolz  
*Morphology of spiny stellate cells in ephrinA5 deficient mice* in **7th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society**. Göttingen, 2007